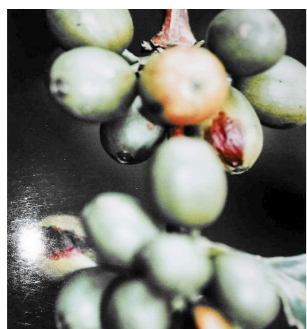


HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Lần thứ 22
Tại Trường Đại học Đông Á, Phân hiệu Đắk Lắk
Ngày 21 - 23/7/2023

THE 22nd NATIONAL CONFERENCE OF PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF VIETNAM
V.P.S. 21 - 23/7/2023



DANH SÁCH TÀI TRỢ HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM LẦN THỨ 22

* **CÁC TỔ CHỨC TÀI TRỢ:** Trường Đại học Đông Á, Phân hiệu Đắk Lắk; Tổ chức Sáng kiến Thương mại bền vững (IDH); Công ty CP TMT Consulting; Công ty TNHH Syngenta Việt Nam; Công ty CP XNK Phân bón Minh Tân; Công ty CP Tín Thành Đạt; Công ty CP Vật tư Nông nghiệp Việt Nông Vin Co; Cửa hàng VTNN Chuyên dùng Anh Sơn Phát; Công ty CP Nông Dược Việt Nam; Công ty TNHH MTV TM Agria Gia Lai; Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.

* **CÁC ĐƠN VỊ TRỰC THUỘC HỘI:** Chi hội Đại học Cần Thơ; Chi hội Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển Nông nghiệp Nha Hồ; Chi hội Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Chi hội Viện Bảo vệ thực vật; Chi hội Đại học Nông Lâm Thái Nguyên; Chi hội Phú Thọ.

* **CÁC CÁ NHÂN:** TS. Nguyễn Văn Bắc; ThS. Nguyễn Hoàng Bảo; ThS. Phạm Quang Hưng; Nhóm cựu sinh viên lớp BVTV K09 - Trường Đại học Tây Nguyên; TS. Trần Ngọc Thanh; PGS. Phạm Văn Dư & TS. Lê Cẩm Loan; GS. Vũ Triệu Mân; TS. Phan Thị Thu Hiền; CN. Hà Thị Thúy; ThS. Đào Thị Lan Hoa; TS. Lê Đăng Khoa; CN. Lê Văn Thành; ThS. Trương Quốc Việt; ThS. Nguyễn Tường Phú; ThS. Vũ Văn Tố.

63-630 - 1/132 - 23
NN-2023



Sách không bán



TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÔNG Á,
PHÂN HIỆU ĐẮK LẮK



HỘI NGHIÊN CỨU
BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM (V.P.S.)



TRƯỜNG
ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN

2023

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM



ISBN 978-604-60-3804-7

Lần thứ 22
Tại Trường Đại học Đông Á, Phân hiệu Đắk Lắk
Ngày 21 - 23/7/2023

THE 22nd NATIONAL CONFERENCE OF PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF VIETNAM
V.P.S. 21 - 23/7/2023



NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP



TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÔNG Á

Website: donga.edu.vn / dakilak.donga.edu.vn - Tel: 02623.518.989

Hiệu trưởng nhà trường: TS. Nguyễn Thị Anh Đào

Trường Đại học Đông Á là một trường đại học đào tạo đa ngành, đa lĩnh vực, là trường đại học tư thục đầu tiên tại Việt Nam có Phân hiệu.

Nhà trường có hai cơ sở đào tạo:

Trường Đại học Đông Á tại Đà Nẵng, địa chỉ: 33 Xô Viết Nghệ Tĩnh, quận Hải Châu, Tp. Đà Nẵng

Trường Đại học Đông Á Phân hiệu tại Đắk Lắk, địa chỉ: 40 Phạm Hùng, phường Tân An, Tp. Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk

Năm học 2023 - 2024 nhà trường tuyển sinh chính quy 39 ngành học tại cơ sở Đà Nẵng và 24 ngành học tại cơ sở Đắk Lắk, thuộc các nhóm ngành: Giáo dục, Kinh tế, Kỹ thuật, Ngoại ngữ, Sức khỏe & KHCS



TỔ CHỨC SÁNG KIẾN THƯƠNG MẠI BỀN VỮNG IDH

Địa chỉ: phòng 401, tòa B1, khu Ngoại giao Đoàn Vạn Phúc, 298 Kim Mã, Q. Ba Đình, Tp. Hà Nội

Người đại diện: ông Huỳnh Tiến Dũng - Giám đốc IDH, Việt Nam

"IDH là một tổ chức phát triển, hợp tác với nhiều đối tác khác nhau để chuyển đổi thị trường theo hướng vì lợi ích của con người, Trái đất và sự tiến bộ xã hội. IDH liên kết các đối tác có trách nhiệm trên các thị trường toàn cầu để tạo ra công ăn việc làm tốt hơn, thu nhập cao hơn, môi trường an toàn hơn và bình đẳng giới cho tất cả mọi người. Phương pháp tiếp cận đặc biệt của IDH là huy động sự tham gia của nhiều bên, đồng thiết kế, đầu tư và triển khai các giải pháp nhằm giải quyết các thách thức toàn cầu trong chuỗi giá trị như mất rừng, biến đổi khí hậu, cải thiện thu nhập của người lao động"





**TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÔNG Á,
PHÂN HIỆU ĐẮC LẮK**



**HỘI NGHIÊN CỨU
BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM (V.P.S.)**



**TRƯỜNG
ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN**

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Lần thứ 22

Tại Trường Đại học Đông Á, Phân hiệu Đắc Lắc

Ngày 21 - 23/7/2023

**THE 22nd NATIONAL CONFERENCE OF PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF VIETNAM
V.P.S. 21 - 23/7/2023**

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

HÀ NỘI - 2023

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Chủ trì Hội thảo:

GS.TS. VŨ TRIỆU MÂN
GS.TS. NGUYỄN THƠ
GS.TS. BÙI CHÍ BỬU
GS.TS. NGUYỄN VĂN TUẤT
PGS.TS. PHẠM VĂN DƯ
TS. NGUYỄN THỊ ANH ĐÀO
PGS.TS. NGUYỄN VĂN NAM
PGS.TS. TRỊNH XUÂN HOẠT
PGS.TS. NGUYỄN ĐẮC KHOA

Ban Biên tập:

GS.TS. VŨ TRIỆU MÂN - Trưởng ban
GS.TS. BÙI CHÍ BỬU - Phó Trưởng ban
PGS.TS. NGUYỄN ĐẮC KHOA - Thường trực Ban Biên tập
GS.TS. BÙI CÁCH TUYẾN - Ủy viên
GS.TS. NGUYỄN VĂN TUẤT - Ủy viên
PGS.TS. TRỊNH XUÂN HOẠT - Ủy viên
PGS.TS. PHẠM VĂN DƯ - Ủy viên
PGS.TS. NGUYỄN VĂN VIẾT - Ủy viên
PGS.TS. HÀ VIẾT CƯỜNG - Ủy viên
TS. ĐẶNG VŨ THỊ THANH - Ủy viên
PGS.TS. NGUYỄN VĂN NAM - Ủy viên
TS. MAI VĂN HÀO - Ủy viên
PGS.TS. TRẦN THỊ THU HÀ - Ủy viên
TS. PHẠM THANH THUYẾT - PT Xuất bản

Tổ Thư ký:

ThS. CHU TRUNG KIÊN
ThS. LÊ THỊ PHƯƠNG LAN

DIỄN VĂN KHAI MẠC

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM LẦN THỨ 22

NGÀY 21 - 23/7/2023 TẠI TÂY NGUYÊN

GS.TS. Vũ Triệu Mân

Kính thưa các vị khách quý,

Thưa các vị đại biểu và toàn thể Hội nghị,

Hôm nay Hội chúng ta có dịp trở lại Tây Nguyên đúng vào dịp 48 năm chiến thắng Buôn Ma Thuột mở đầu cho cuộc tổng tiến công và chiến dịch Hồ Chí Minh lịch sử giải phóng hoàn toàn miền Nam thống nhất đất nước vào ngày 30/4/1975.

Hội thảo lần thứ 22 của Hội hôm nay được tổ chức với sự giúp đỡ nhiệt tình của Trường Đại học Đông Á Đà Nẵng và Trường Đại học Tây Nguyên. Thay mặt ban lãnh đạo Hội và toàn thể hội viên chúng tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn tới hai trường và các đơn vị tài trợ, giúp đỡ kinh phí, nơi ăn ở cho các đại biểu cũng như đóng góp tổ chức hai ngày tham quan, du lịch Tây Nguyên sau Hội thảo.

VỀ TÌNH HÌNH CHUNG CỦA HỘI

Về phát triển tổ chức: năm 2001 năm 2008 năm 2018 năm 2022

a) Số hội thành viên	4	14	20	25
b) Tổng số hội viên	60	300	680	802
c) Hội viên trí thức	100%	100%	100%	100%

1) Trong 22 năm qua Hội đã tổ chức 22 cuộc hội thảo tại các địa điểm khác nhau trên cả nước như: Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, Đại học Nông nghiệp I Hà Nội (nay là Học viện Nông nghiệp Việt Nam), Viện Cây ăn quả miền Nam, Đại học Vinh, Viện KHKT Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, Viện KHKT Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc, Viện Nghiên cứu Cây bông và PTNN Nha Hồ, Đại học Nông Lâm Huế, Đại học Sư phạm Đà Nẵng, Đại học Cần Thơ, Đại học Đông Á Đà Nẵng... Các cuộc hội thảo đã công bố 693 công trình nghiên cứu khoa học với trên 6.112 trang in. Trong số các công trình này có tới 564 công trình có ứng dụng phòng trừ trực tiếp mang lại hiệu quả kinh tế thiết thực cho các loại cây trồng gồm lúa, rau, hoa, quả, cây công nghiệp, trong đó nhiều cây có giá trị xuất khẩu cao... Nhiều vi sinh vật gây bệnh mới có tên các tác giả Việt Nam đã có trong Ngân hàng gene của thế giới.

2) Đưa ra các giống chống chịu bệnh, các hệ thống, các phương hướng phòng trừ mới, sản xuất nhiều sản phẩm chẩn đoán, nhiều chế phẩm sinh học

Hội đã quan tâm tới việc chọn, tạo ra các giống, dòng cây chống bệnh như: các giống lúa kháng đạo ôn, giống lúa kháng bạc lá (Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu và ctv.; Phạm Văn Dư, Lê Cẩm Loan và ctv.; Phan Hữu Tôn và ctv.; Bùi Trọng Thủy và ctv.). Chọn giống chống vàng lùn lúa cỏ (Phạm Văn Dư và ctv.). Chọn giống khoai mì - sản phẩm chống TMV (Nguyễn Thơ và ctv.). Chọn giống thuốc lá chống TMV bằng kỹ thuật RNAi (Phạm Thị Vân). Chuyển gene tạo giống đu đủ kháng bệnh PRSV (Hà Viết Cường, Vũ Triệu Mân và ctv.; Chu Hoàng Hà và ctv.), giống dưa hấu kháng PRSV (Nguyễn Thị Thanh Nga và ctv.), giống chống bệnh vàng lá cam (Nguyễn Văn Hòa và ctv.), giống kháng virus Tristeza (Nguyễn Văn Phương và ctv.). Chọn giống chanh leo kháng virus (Nguyễn Văn Việt và ctv.), nghiên cứu giống trong tập đoàn ớt cay chống bệnh đốm gân lá virus (Đỗ Xuân Điệp, Hà Viết Cường, Vũ Triệu Mân). Nghiên cứu giống chống vi khuẩn gây héo xanh (Trần Ngọc Hùng và ctv.; Trần Thị Ba và ctv.). Phát hiện gene kháng rầy nâu bằng chỉ thị phân tử DNA (Phan Hữu Tôn và ctv.). Phát hiện giống chống thối rễ sầu riêng (Đặng Thị Kim Uyên và ctv.). Phát hiện giống hoa cúc chống độc tố nấm *Fusarium* (Lê Nguyễn Lan Thanh và ctv.). Nghiên cứu giống gừng chống tuyến trùng (Trần Vũ Phấn và ctv.).

Hội đã phối hợp với Công ty Vinaxanh dùng *hữu cơ sinh học* phòng chống thành công nhiều bệnh hại nguy hiểm trên hồ tiêu, bệnh phytophthora hại cây ca cao, bệnh thán thư trên ớt, bệnh hại thanh long, cây cam, cây xoài và các cây ăn quả xuất khẩu trên hơn 10 tỉnh và hơn 20 loại cây trồng khác nhau trong 8 năm trước đây. Hiện nay chương trình áp dụng hữu cơ sinh học đang được GS. Nguyễn Thơ chủ trì phối hợp với các nhà khoa học Nhật Bản triển khai ở Tây Nguyên và hai miền Nam, Bắc có triển vọng.

Hội trở thành nơi tập hợp các đơn vị đi đầu trong nước về nghiên cứu cải tiến kỹ thuật mới trong nghiên cứu bệnh hại thực vật và giống kháng bệnh. Hội và phòng thí nghiệm Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới (Học viện Nông nghiệp Việt Nam) đã sản xuất *kit ELISA virus Tristeza, PVX, PVY, ToMV, virus lúa lùn xoắn lá - RRSV, virus lúa cỏ - RGSV, virus lúa vàng lụi - RYSV và virus lúa lùn sọc đen phương nam - SRBSDV* bằng phương pháp tái tổ hợp protein thành công. Các bộ kit chẩn đoán đã được nhận cúp vàng trong Hội chợ Triển lãm kinh tế kỹ thuật Việt Nam - ASEAN + 3 (Kit đã được Trung tâm Kiểm định sinh phẩm Bộ Y tế làm thử nghiệm so sánh với một số kit do Hãng AGDIA (Mỹ) nhập khẩu có kết quả tương đương). Đây là kết quả quan trọng, giúp các tỉnh vùng dịch tiết kiệm kinh phí và đã phục vụ chẩn đoán bệnh virus RRSV và RGSV hại lúa ở miền Tây Nam Bộ trong đợt dịch 2010. Viện BVTV đã sản xuất kit chẩn đoán bệnh vàng lá Greening 2017 - 2020.

Sản phẩm *Trichoderma* (Đại học Cần Thơ) đã được thương mại hóa nhiều năm giúp chống bệnh hại cây ăn trái có nguồn gốc từ đất ở đồng bằng Sông Cửu Long. Các chế phẩm *Trichoderma* của Viện Bảo vệ thực vật có tác dụng trừ nấm trong đất, Viện còn có các: chế phẩm sinh học trừ nấm thối xám, hoàn thiện chế phẩm chống bệnh chết nhanh, chết chậm cây hồ tiêu 2014 - 2016, chế phẩm *Phyto - M* phòng trừ nấm *Phytophthora* trên cây có múi, xoài, sầu riêng và hồ tiêu. Viện Bông Nha Hồ sản xuất *Trichoderma* đã có hiệu quả trừ bệnh trên cây bông, nho và cây trồng trong khu vực Ninh Thuận. *Trichoderma* của Học viện Nông nghiệp Việt Nam Hà Nội. *Chế phẩm vi sinh nấm Vinana* và *chế phẩm Hugo* trừ tuyến trùng trên cây cà phê, hồ tiêu của Chi hội Đại học Tây Nguyên đã kết hợp được kỹ thuật của Hàn Quốc thành công tại Đắk Lắk. Chế phẩm sinh học trừ rầy *nấm Beauveria* và *Metarizhium* của Viện Lúa đồng bằng Sông Cửu Long, *chế phẩm vi khuẩn Pseudomonas putida* của chi hội Đại học Nông Lâm Huế chống bệnh hại vùng rễ, được công nhận là sản phẩm tự hào trí tuệ Việt Nam 2016 ngoài ra tác giả còn nhận 22 giải thưởng cấp bộ và cấp tỉnh khác. Viện Lúa đồng bằng Sông Cửu Long thực hiện quy trình quản lý tổng hợp bệnh đạo ôn lúa. *Chế phẩm Chaetomium CP2-VMNPB* trừ *nấm* hại chè, cà phê, cao su 2015. *Chế phẩm CPITT-VMNPB* chống tuyến trùng 2020 của Viện KHKT Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc. *Chế phẩm sinh học HTD-CNSH-CF* ảnh hưởng sinh trưởng của cây cà phê, *chế phẩm sinh học CAFÉ-HTDO1, HOTIEU-HTDO3* chống bệnh hại hồ tiêu, cà phê. Một số vi khuẩn, xạ khuẩn cũng đã được Viện Công nghệ Sinh học nghiên cứu có tác dụng chống nấm *Penicillium digistatum, colletotrichum* sp. Viện Công nghệ Sinh học cũng đã nghiên cứu *nấm Paecilomyces* sp. có khả năng hạn chế tiêu diệt các loại tuyến trùng. Viện Công nghệ Sinh học còn là nơi ứng dụng nhiều kỹ thuật sinh học phân tử như: *ứng dụng cơ chế RNAi, lập bản đồ liên kết gene bằng chỉ thị SSR, tạo đột biến gene, chỉnh sửa gene, chuyển gene đa đoạn.*

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật nghiên cứu tuyến trùng liên quan bệnh chết héo cây thông, tuyến trùng hại cà phê, tuyến trùng hại vải và thử nghiệm *thuốc thảo mộc Sông Lam ND50* trừ tuyến trùng, các cộng tác viên phối hợp với tác giả Shin san Ichi Ito đã có nhiều năm nghiên cứu vi sinh vật đối kháng chống vi khuẩn *Pseudomonas solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh cây họ cà. Nhóm nghiên cứu đã công bố *chế phẩm vi khuẩn đối kháng Pseudomonas monteillii*. Nguyễn Xuân Hồng và *ctv.* nghiên cứu phòng trừ bệnh vi khuẩn héo xanh lạt.

Viện Nghiên cứu Cao su thực hiện 6 đề tài cấp Tập đoàn phòng chống bệnh cây cao su, trong đó có đề tài *Sử dụng chế phẩm gây rụng lá nhân tạo* phòng trừ bệnh phấn trắng trên vườn cao su giao tán. Viện KHKT Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên nghiên cứu biện pháp chống tuyến trùng cho cây cà phê và hồ tiêu, chống bệnh *Phytophthora* hại

cây cao cao. Viện Nghiên cứu Cây bông và PTNN Nha Hồ nghiên cứu phòng chống bệnh nấm trên cây bông và nho tại Nam Trung Bộ. Viện Khoa học Nông nghiệp miền Nam đã thực hiện nhiều quy trình phòng trừ bệnh cho cây trồng. Từ 2017 - 2019 đã ứng dụng chế phẩm sinh học phòng trừ tuyến trùng hại cây khổ qua (mướp đắng) và cây cà tím, đã ứng dụng chế phẩm nano bạc trong phòng trừ bệnh rau tại Bà Rịa - Vũng Tàu. Viện Công nghệ Sinh học đã ứng dụng *nano bạc* và đồng ức chế nấm *Penicillium digitatum* gây bệnh mốc xanh. Học viện Nông nghiệp Việt Nam nghiên cứu chỉ thị phân tử DNA trong chọn tạo giống lúa, cà chua chống bệnh, chủ trì 3 dự án hợp tác quốc tế về nghiên cứu chọn giống chống bệnh.

Hội đã đóng góp quan trọng trong kết quả dập tắt dịch bệnh lúa lùn xoắn lá, lúa vàng lùn tại miền Tây Nam Bộ và bệnh lúa lùn sọc đen phương nam và bệnh vàng lụi ở miền Bắc Việt Nam cùng nhiều bệnh khác bảo vệ được sản xuất.

Hội đã xác định nhiều bệnh mới ở thực vật phát hiện và nghiên cứu bệnh xanh lùn bông ở Viện Nghiên cứu Cây bông và PTNN Nha Hồ và Học viện Nông nghiệp Việt Nam tại Hà Nội phát hiện một số bệnh virus mới ở thực vật tại miền Bắc Việt Nam như Kurzu mosaic virus, bệnh lúa vàng lụi, bệnh lúa lùn sọc đen phương nam, đặc biệt bệnh lúa lùn sọc đen chuyên gia IRRI phát hiện nhằm đã được Phòng thí nghiệm Bệnh cây nhiệt đới Đại học Nông nghiệp I và cán bộ Hội phát hiện đúng, kịp thời, đã giúp Bộ Nông nghiệp và PTNT chỉ đạo kịp ngăn chặn dịch bùng phát trên lúa ở miền Bắc Việt Nam. Các tác giả Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Viện Bảo vệ thực vật và Học viện Nông nghiệp Việt Nam phát hiện các virus trên chanh leo, phát hiện nhiều bệnh hại truyền qua hạt giống các cây trồng như lúa, ngô, rau và bệnh trên cây dược liệu. Tại Đại học Nông nghiệp I năm 1995 đã nghiên cứu bệnh chùm ngọn chuối (Banana bunchy top virus) ở Việt Nam. Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, Viện Bảo vệ thực vật phát hiện virus gây bệnh khảm lá sắn ở Việt Nam. Viện Bảo vệ thực vật đã nghiên cứu các bệnh Phytoplasma ở Việt Nam như bệnh chồi cỏ mía, trắng lá mía, phytoplasma hại lúa, bệnh chồi rỗng hại nhãn bằng phương pháp sinh học phân tử góp phần định loại nhóm bệnh phytoplasma ở Việt Nam. Viện Bảo vệ thực vật đã chủ trì và cùng tham gia phát hiện 8 bệnh virus mới, 29 bệnh nấm, 1 bệnh tuyến trùng. Viện đã hướng dẫn nông dân phòng chống dịch rầy nâu ở miền Tây Nam Bộ chống lây lan bệnh virus bảo vệ sản xuất trong nhiều năm.

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam phát hiện virus trên tập đoàn khoai môn, khoai, khoai sọ. Viện Bảo vệ thực vật và Đại học Nông nghiệp I cùng các chuyên gia Australia phát hiện nấm *phytophthora* là nguyên nhân gây bệnh thối nõn cây dứa. Đại học Nông nghiệp I đã xác định bệnh do nấm *Phytophthora* hại cây cói ở miền Bắc Việt

Nam, Viện Lúa đồng bằng Sông Cửu Long áp dụng quy trình quản lý tổng hợp bệnh đạo ôn hại lúa.

Trong nhiều năm Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ được sự cộng tác của các nhà khoa học Đan Mạch đã nghiên cứu sử dụng chất kích kháng có nguồn gốc khác nhau trong phòng chống bệnh hại cây, dùng hóa chất gây kích kháng, dùng vi sinh vật đối kháng, dùng dịch trích thực vật. Những nghiên cứu này mở thêm một hướng nghiên cứu mới có triển vọng ngành bệnh cây Việt Nam trong những năm tới.

Các biện pháp phòng trừ của Hội đã đi đúng hướng bảo vệ môi trường với nhiều biện pháp sinh học và canh tác kết hợp. Tuy nhiên cách phát huy các biện pháp này lâu dài còn rất khó khăn. Trong khi đó chúng ta chưa qua tâm thích đáng tới nghiên cứu giống chống bệnh một biện pháp rất hiệu quả và ít bị ảnh hưởng của môi trường.

Tại Viện Cây ăn quả miền Nam một cách tiếp cận với nông dân trong việc hướng dẫn phòng trừ bệnh cây đã được thực hiện, đó là việc tổ chức Bệnh viện cây trồng theo kinh nghiệm của các nhà khoa học Đan Mạch đã thành công trong việc thực hiện mô hình này. Nhiều cơ quan trong nước đã học tập mô hình này để mở rộng chuyển giao kỹ thuật phòng chống bệnh cho nông dân. Đặc biệt có những đề tài phục vụ các đảo xa như nghiên cứu biện pháp phòng chống tổng hợp các loại sâu bệnh chính hại cây xanh che bóng trên quần đảo Trường Sa (Viện Bảo vệ thực vật) và các giải pháp mang tính tổng hợp như ba giảm ba tăng trong sản xuất thâm canh lúa hay cánh đồng mẫu lớn (Viện Lúa đồng bằng Sông Cửu Long).

3) Một số sách, tài liệu bệnh cây và liên quan đến bệnh cây trong khoảng 20 năm qua đã được xuất bản: Nguyễn Ngọc Châu, Nguyễn Vũ Thanh *Tuyển trùg ký sinh thực vật Việt Nam* Nxb. Khoa học Kỹ thuật Hà Nội 2000. Bùi Chí Bửu *Tương tác giữa ký sinh và ký chủ trong bệnh cây trên cơ sở sinh học phân tử* Nxb. Nông nghiệp 2002. Bùi Chí Bửu chủ biên *Cơ sở di truyền tính kháng sâu bệnh hại cây trồng* Nxb. Nông nghiệp 2002 (Nguyễn Thị Lang, Phạm Văn Dur, Hồ Xuân Thiện tham gia viết phần di truyền và bệnh cây). Vũ Triệu Mân *Chẩn đoán nhanh bệnh hại cây trồng* Nxb. Nông nghiệp 2003. Phạm Văn Biên, Bùi Cách Tuyền (đồng chủ biên) *Cẩm nang sâu bệnh hại cây trồng* Quyển 1, 2 Nxb. Nông nghiệp, 2003, 2004. Nguyễn Văn Viên, Đỗ Tấn Dũng *Bệnh cà chua do nấm, vi khuẩn và biện pháp phòng chống* Nxb. Nông nghiệp 2003. Đặng Vũ Thị Thanh *Các loại nấm gây hại cây trồng ở Việt Nam* Nxb. Nông nghiệp 2008. Vũ Triệu Mân *Bệnh virus hại lúa* Nxb. Nông nghiệp 2009. Vũ Triệu Mân (chủ biên) *Bệnh virus hại thực vật ở Việt Nam* Tập I và 2 Nxb. Nông nghiệp 2010 - 2012 (sách chuyên khảo). Phạm Quang Thu *Sâu bệnh hại rừng trồng* Nxb. Nông nghiệp 2011. Nguyễn Văn Tuất *Nghiên cứu và ứng dụng các tác nhân, chế phẩm sinh học*

trong *Bảo vệ thực vật* Nxb. Nông nghiệp 2011. Nguyễn Văn Tuất, Phạm Ngọc Dung *Nghiên cứu nấm Phytophthora gây bệnh chết nhanh cây hồ tiêu và biện pháp quản lý bệnh tổng hợp* Nxb. Nông nghiệp 2012. Tác giả Nguyễn Văn Tuất còn tham gia viết 5 cuốn sách tiếng Anh xuất bản ở nước ngoài và ở Việt Nam. Bùi Cách Tuyến (chủ biên) *Tuyến trùng hại cây trồng* Nxb. Nông nghiệp 2013. Bùi Cách Tuyến (đồng chủ biên) *Cây hồ tiêu, bệnh hại và biện pháp phòng trừ*, Nxb. Nông nghiệp 2013. Phạm Văn Kim *Các bệnh hại lúa quan trọng ở đồng bằng Sông Cửu Long* Nxb. Nông nghiệp 2016. Vũ Triệu Mân, Nguyễn Văn Tuất, Bùi Cách Tuyến, Phạm Văn Kim (đồng chủ biên) và 82 tác giả *Bệnh hại cây trồng Việt Nam* sách dày 643 trang khổ 19 × 27 cm, Nxb. Học viện Nông nghiệp Việt Nam 2018 (sách chuyên khảo) là một tài liệu tổng hợp. Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát, Phạm Bích Ngọc, Lê Trần Bình, Phạm Thị Vân *Ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống cây trồng kháng bệnh virus*, Nxb Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 2021 (sách chuyên khảo). Cùng với sách xuất bản trong và ngoài nước, rất nhiều công trình đã được công bố trên các tạp chí quốc tế, các tác giả đã góp phần giới thiệu và tạo mối liên lạc quốc tế. Trong đó có nhiều bài đăng trên các tạp chí hàng đầu về bệnh cây trên thế giới như các tạp chí bệnh cây nổi tiếng: *Phytopathology, Journal of General Virology, Archive of Virology, Nemethodology*. Ở trong nước PGS. Phạm Văn Kim và một số hội viên còn tham gia suốt 20 năm qua trong các chương trình hướng dẫn phòng trừ bệnh hại cây trồng trên Đài Truyền hình Thành phố Cần Thơ và các tỉnh miền Nam. Ở miền Bắc, trong một số năm gần đây tác giả Đinh Văn Đức cũng đã tham gia giải đáp các kỹ thuật phòng chống bệnh hại cây trên Truyền hình VTC 16.

4) Về tài chính của Hội: Nguồn tài chính của Hội luôn chỉ có số lượng nhỏ phục vụ cho mỗi kỳ Hội thảo và in tài liệu, cho chi phí văn phòng và cho hợp tác quốc tế. Hàng năm hội phí của các hội viên, tiền ủng hộ của các đơn vị và cá nhân được đưa vào quỹ của Hội. Một số đơn vị đã cho mượn Hội trường, góp cơ sở vật chất cho các cuộc Hội thảo cũng giúp giảm kinh phí hàng năm. Nói về tài trợ cho Hội, chúng ta luôn tưởng nhớ tới Giám đốc *Công ty Hợp danh sinh học nông nghiệp* Trần Minh Thành, đã rất nhiều năm lúc sinh thời anh luôn tài trợ, giúp đỡ Hội chúng ta ổn định hoạt động. Chúng tôi cũng luôn nhớ *Công ty Nông Việt* do Giám đốc Đinh Quốc Hòa đã nhiều năm đóng góp cho các cuộc Hội thảo của Hội. Công ty cổ phần BVTV TƯ I, nhiều công ty, doanh nghiệp, nhiều chi hội hàng năm ngoài hội phí đã quan tâm tài trợ cho Hội như Chi hội Đại học Cần Thơ, Chi hội Viện Công nghệ sinh học Hà Nội, Chi hội Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam, Chi hội Đại học Tây Nguyên và Viện KHKT Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, kể cả các hội viên cá nhân... đều bằng mọi cách giúp Hội ổn định hoạt động. Hội và Trường Đại học Đông Á cũng hướng tới ký

kết chương trình hợp tác dự án nghiên cứu, chuyển giao công nghệ và trao đổi chuyên gia trong lĩnh vực bệnh hại thực vật, nông nghiệp, nông thôn để phát triển tại Đà Nẵng và khu vực Tây Nguyên.

Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia của chúng ta đã tồn tại và phát triển trong hơn 20 năm qua, nhiều năm gần đây đã được công nhận là tài liệu khoa học có giá trị cao được cấp chỉ số ISBN. Đóng góp vào việc này là công lao của toàn Hội trong đó Ban biên tập có công lớn cho việc duy trì chất lượng tài liệu này. Biên tập viên TS. Phạm Thanh Thủy thường trực Ban biên tập là người sắp bài đưa in cuối cùng, là cán bộ Ban biên tập có công lao lớn suốt hơn 20 năm qua cho sự tồn tại của kỷ yếu. Những năm gần đây biên tập viên Nguyễn Đắc Khoa, Phó Tổng thư ký Hội được phân công cùng thường trực Ban biên tập đã đóng góp cho việc tiếp tục nâng cao chất lượng bài. Từ năm 2022 Ban biên tập chính thức thành lập, mặc dù bận nhiều việc, các thành viên đã rất cố gắng duyệt và góp ý các bài đúng thời hạn. Ban Chấp hành Hội chân thành cảm ơn các anh, chị. Ban Chấp hành cũng cảm ơn các hội viên đã thường xuyên đóng hội phí, các đơn vị tài trợ đã giúp cho kỷ yếu tồn tại và phát triển.

BÁO CÁO HOẠT ĐỘNG CỦA HỘI NGHIÊN CỨU BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM NĂM 2021 - 2022

1) Công tác tập hợp trí thức: Phát huy truyền thống đoàn kết nhất trí của Hội từ khi mới thành lập, hưởng ứng lời kêu gọi của Đảng và Chính phủ Hội đã nhắc nhở các đơn vị trong toàn quốc khôi phục các hoạt động sau đại dịch trong tình hình mới. Ban Chấp hành đã chú ý tiếp tục phát triển tổ chức và xây dựng các đơn vị Chi hội lớn hơn không chỉ bó hẹp trong một cơ quan mà có thể mở rộng trong một tỉnh, một thành phố. Phổ biến rộng rãi điều lệ của Hội chuẩn bị tiếp tục phát triển nghiên cứu khoa học và phục vụ sản xuất sau đại dịch. Hội đã thành lập thêm chi hội mới ở Viện Nghiên cứu Lâm nghiệp, Chi hội Trường Đại học Đông Á Đà Nẵng, Chi hội Khoa Công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ thuộc Đại học Quốc gia Hà Nội. Mở rộng Chi hội Viện KHKT Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc thành Chi hội Phú Thọ (bao gồm cả thành viên của Trường Đại học Hùng Vương và Trường Đại học Sư phạm). Hội đã chuyển dịch Văn phòng từ Học viện Nông nghiệp Việt Nam sang Viện Bảo vệ thực vật. Từ cuối năm 2021 đến nay đã có thêm hơn 40 hội viên mới xin tham gia Hội ở khắp các vùng Bắc, Nam, miền Trung và Tây Nguyên. Phấn đấu đến hết nhiệm kỳ này Hội sẽ có gần 900 hội viên.

2) Thông tin phổ biến kiến thức: Bệnh khảm lá sắn là một bệnh virus nguy hiểm nhanh chóng làm chết hàng loạt cây gây mất mùa sắn - cây lương thực hàng đầu của

châu Phi. Bệnh đã lan dần qua các châu lục và một số năm gần đây đã xuất hiện và phá hoại ở một số vùng miền núi nước ta gây thiệt hại nghiêm trọng. Để thực hiện nhiệm vụ phổ biến kiến thức thực hiện đề tài đăng ký với Liên hiệp Hội, Chi hội Viện Bảo vệ thực vật tổ chức Hội nghị tập huấn tại xã Thượng Ninh, huyện Như Xuân, tỉnh Thanh Hóa cho 60 học viên của địa phương về Kỹ thuật nhận dạng và phòng chống bệnh virus khảm lá sắn. Hội nghị tập huấn đã thực hiện từ ngày 3/6 đến ngày 5/6/2022 với các nội dung lý thuyết và thực nghiệm đồng ruộng mang lại hiệu quả thiết thực cho việc phòng chống bệnh tại địa phương. Đợt tập huấn đã thành công.

3) Nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ: Đến đầu năm 2022 đã có 72 công trình nghiên cứu của các hội viên được công bố, có đến 23 công trình nghiên cứu các biện pháp sinh học dùng vi khuẩn đối kháng 8 bài dùng vi khuẩn đối kháng, 6 bài dùng xạ khuẩn đối kháng, 5 bài dùng nấm đối kháng, 2 bài về bacteriophage, 2 bài dùng dịch trích thực vật. 25 bài còn lại có 9 bài về các biện pháp canh tác, hữu cơ, dùng giống chống bệnh. 16 bài còn lại có 12 bài nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh nấm và 4 bài về nguyên nhân gây bệnh do vi khuẩn. Nói chung các nghiên cứu đã đi đúng hướng và năm 2022 cũng có xu hướng tương tự. Tuy nhiên hiện nay các sản phẩm muốn có giá trị cao phải tuân theo chuỗi giá trị qua nhiều bước thực hiện vì vậy nghiên cứu của chúng ta cần phát hiện bệnh trên nhiều dạng của một loại sản phẩm.

4) Các hoạt động khác: Theo điều lệ Hội do Bộ Nội vụ phê duyệt, Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam đang xin chuyển báo cáo Hội thảo Quốc gia hàng năm thành *Tạp chí Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam (Vietnamese Phytopathology)* bằng hai thứ tiếng Việt Nam và tiếng Anh. Tạp chí này sẽ giúp cho Hội thực hiện rộng rãi giao lưu quốc tế. Tuy nhiên do các thủ tục còn đang được hoàn thiện dần, việc đổi sang tạp chí còn cần có thời gian.

5) Phương hướng hoạt động mới của Hội: Hiện nay tình hình trong nước và thế giới có nhiều biến chuyển nhanh chóng. Cách hoạt động của Hội chúng ta không thể tiếp tục như cũ. Hội kêu gọi các chi hội cần có quan điểm đổi mới nhanh chóng, tìm hiểu những vấn đề trong sản xuất cần đến sự giúp đỡ của các kiến thức khoa học của chúng ta. Có những kỹ thuật chưa biết phải học để làm. Mở rộng việc hợp tác quốc tế, tích cực tham gia các chương trình trên lãnh thổ Việt Nam. Từ đó tìm ra đề tài, chương trình tạo kinh phí để hoạt động. Nếu chỉ làm việc như cũ Hội chúng ta sẽ không thể hoạt động, không làm được nghiên cứu và phục vụ sản xuất như trước đây.

Ngày thành lập Hội chỉ có 60 hội viên, đến nay chúng ta đã có hơn 800 hội viên, Hội có 10 giáo sư (Hà Minh Trung, Vũ Triệu Mân, Nguyễn Thơ, Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Thị Thu Cúc, Nguyễn Văn Tuất, Bùi Cách Tuyến, Phạm Hữu Tôn,

Phạm Xuân Hội); 20 Phó giáo sư và hơn 100 Tiến sĩ. Với các hoạt động trong và ngoài nước rất phong phú, thể hiện rõ vai trò của ngành bệnh cây với sản xuất và đời sống xã hội. Ngày nay Hội đã có tư cách pháp nhân, thành viên của Hội Bệnh cây châu Á Thái Bình Dương và có quan hệ với nhiều hội bệnh cây thế giới, chúng ta cần quyết tâm mạnh mẽ tiến lên.

Giờ phút này chúng ta luôn tưởng nhớ đến các thế hệ đi trước và các đồng nghiệp đã mãi mãi đi xa như các nhà nghiên cứu bệnh cây Nguyễn Hữu Thụy, Bùi Văn Ích, Vũ Khắc Nhượng, Lê Văn Thuyết, Vũ Hoan, Phạm Văn Biên... đóng góp của các anh cho ngành bệnh cây Việt Nam sẽ mãi được chúng tôi ghi nhớ.

Kết thúc lời khai mạc này Ban chấp hành Hội và toàn thể hội viên vô cùng thương tiếc PGS. Phạm Văn Kim, nguyên Phó Chủ tịch Hội đã vĩnh viễn đi xa chúng ta vào ngày 14/5/2023 sau một thời gian lâm bệnh nặng. Chúng tôi xin đề nghị toàn thể hội nghị giành một phút mặc niệm để tưởng nhớ PGS. Phạm Văn Kim.

VÔ CÙNG THƯƠNG TIẾC PGS. PHẠM VĂN KIM, NHÀ KHOA HỌC LỚN CỦA NGÀNH BỆNH CÂY VÀ BẢO VỆ THỰC VẬT VIỆT NAM



Vô cùng thương tiếc PGS. Phạm Văn Kim, người anh, người thầy, người bạn, người đồng chí thân thiết của nhiều thế hệ các cán bộ nghiên cứu, giảng dạy bệnh cây và đông đảo nông dân lao động đồng bằng Sông Cửu long và cả nước.

PGS. Phạm Văn Kim sinh ngày 07 tháng 10 năm 1940 tại Gò Công Tây, Cần Thơ. Ngay khi còn là học sinh trung học phổ thông ông đã theo gia đình lên Di Linh, Lâm Đồng chăm bón vườn cà phê tiếp xúc với nghề nông từ lúc ấy. Rồi ông xin vào học Khoa Nông học, tốt nghiệp Ngành Nông học ông nhận công việc tại Viện Khảo cứu Nông nghiệp Sài Gòn. Năm 1967, ông được biệt phái sang làm việc tại Trường Cao đẳng Nông nghiệp thuộc Viện Đại học Cần Thơ - nay là Trường Đại học Cần Thơ. Từ năm 1973 - 1976 ông nhận được học bổng cao học và thực hiện học tập tại Nhật Bản. Sau những năm học tập và làm việc tại Nhật Bản, ông đã quyết định không tiếp tục làm tiến sĩ mà trở về khi đất nước còn vô cùng nhiều khó khăn sau giải phóng. Năm 1977 ông về làm việc tại Trường Đại học Cần Thơ. Năm 1980 ông trở thành Phó Chủ nhiệm Khoa Trồng trọt, năm 1990 kiêm chức Trưởng Bộ môn Bảo vệ thực vật cho đến lúc nghỉ hưu. Trong suốt mấy chục năm qua ông đã đem hết nhiệt tình và sức lực xây dựng Ngành Bảo vệ thực vật, Ngành Bệnh cây của Đại học Cần Thơ thành một đơn vị khoa học vững mạnh, đóng góp cho nghiên cứu, giảng dạy, đào tạo nhiều nhà khoa học trẻ cho Ngành. Đặc biệt từ những ngày đầu mới thành lập Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam, với cương vị là Phó Chủ tịch Hội ông đã có rất nhiều đóng góp xây dựng và phát triển tổ chức của Hội để Hội phát triển như ngày nay. Là người thầy của nhiều thế hệ học trò ông đã giảng dạy cho nhiều khóa học, hướng dẫn hơn 200 sinh viên làm luận án tốt nghiệp, 30 học viên cao học và 3 tiến sĩ Ngành Bệnh cây, Bảo vệ thực vật.

Ông tham gia viết nhiều giáo trình của Ngành, là tác giả nhiều sách chuyên môn như: “*Sâu bệnh hại lúa quan trọng ở đồng bằng Sông Cửu Long*”, Nxb. Đồng Tháp 1996; “*Các nguyên lý bệnh hại cây trồng*”, Nxb. Đại học Cần Thơ năm 2000; “*Vi sinh*

học đại cương” năm 2000; “*Vi sinh vật đất*” năm 2000; “*Sinh lý sinh thái nấm*” năm 2003; “*Phân loại nấm*” năm 2004. Là một trong bốn tác giả chủ biên cuốn “*Bệnh hại cây trồng Việt Nam*” có 82 tác giả viết dài hơn 643 trang xuất bản năm 2018.

Ông tham gia và chủ trì nhiều công trình nghiên cứu như: cùng GS. Võ Tòng Xuân, PGS. Nguyễn Văn Huỳnh phòng chống dịch rầy nâu ở đồng bằng Sông Cửu Long thành công vào năm 1978. Trong nhiều năm ông cùng nhóm nghiên cứu của Bộ môn Bảo vệ thực vật đã góp phần phát hiện phòng trừ bệnh vàng lá, chín sớm, bệnh thối rễ cây có múi và thực hiện dùng chất kích kháng chống bệnh trên cây trồng có hiệu quả. Đặc biệt trong phòng chống dịch bệnh lúa lùn xoắn lá, vàng lùn ông đã tích cực tham gia ban chống dịch và chỉ đạo dùng kit ELISA (sản phẩm của Hội) chẩn đoán phát hiện sớm bệnh, góp phần tham gia tổ chức gieo sạ đồng loạt chống bệnh thành công.

Ông tham gia và chủ trì nhiều hoạt động hợp tác nghiên cứu khoa học với các chương trình của IRRI, DANIDA-INDICA, CABI v.v....

Là người bạn lớn của nông dân, từ năm 1978 ông đã tham gia hướng dẫn kỹ thuật phòng chống bệnh hại cây trồng trên Đài Phát thanh và Truyền hình thành phố Hồ Chí Minh, Cần Thơ và sau này là các tỉnh Sóc Trăng, An Giang, Hậu Giang, Vĩnh Long, Tiền Giang, Kiên Giang, Đồng Tháp, Long An.

Với rất nhiều thành tích trong quá trình công tác ông đã nhận được nhiều danh hiệu và giải thưởng khoa học. Được nhận danh hiệu Nhà giáo ưu tú năm 1992, hai Bằng khen của Thủ tướng Chính phủ, Danh hiệu Bông lúa vàng 2010, nhiều Bằng khen của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Bộ Giáo dục và Đào tạo. Nhiều huy chương và kỷ niệm chương trong đó có Huy chương Vì sự nghiệp truyền hình.

Ông mất đi là Hội mất một người anh lớn, luôn ân cần chu đáo với các thế hệ trẻ; những người nông dân mất đi một nhà khoa học luôn thương yêu giúp đỡ, chỉ bảo từng chi tiết phòng chống bệnh hại; Trường Đại học Cần Thơ và Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật mất đi một người thầy, một nhà khoa học lớn của Ngành.

Ban Chấp hành Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam và toàn thể hội viên của Hội sẽ mãi mãi ghi nhớ tấm gương trong sáng của ông. Ông sẽ sống mãi trong sự nghiệp của Hội chúng ta.

Chủ tịch Hội
GS.TS. Vũ Triệu Mân

TỔNG QUAN: GIỐNG KHÁNG BỆNH TRONG KỶ NGUYÊN OMICS

Bùi Chí Bửu¹, Nguyễn Thị Lang¹

¹Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

TÓM TẮT

Cơ chế phân tử liên quan đến tính kháng bệnh số lượng chưa được biết nhiều, tuy nhiên có những tiến bộ được ghi nhận mấy năm gần đây. Đó là tính kháng số lượng với những thụ thể nhận biết, đặc biệt là thụ thể NLR, phát hiện ra những effectors của pathogen bên trong tế bào. Các thành phần truyền tín hiệu miễn dịch bao gồm một loạt sự kiện: yếu tố phiên mã TFs, protein kinases,... Chúng được quan sát trong nội dung truyền tín hiệu và phản ứng tự vệ của cây trồng. Chưa bao giờ vai trò của phytohormones (hệ biến dưỡng) thu hút được sự chú ý nhiều đến như vậy. Đây là hợp chất có phân tử nhỏ điều tiết các tiến trình truyền tín hiệu, sản sinh ra những cơ chế biến dưỡng, thông qua tương tác với các protein thụ thể. Phytohormones, bao gồm JA, SA, ethylene (ET), abscisic acid (ABA), auxin, gibberellins (GAs), cytokinins (CKs), và brassinosteroids (BRs), tích cực tham gia hệ thống tự vệ của cây trồng. Di truyền biểu sinh có vai trò quan trọng trong hệ thống phòng thủ cục bộ tại nơi bị xâm nhiễm và có thể tạo ra hệ thống kích kháng tại những mô cách xa đó. Chính sửa hệ gen tại vùng đích promoters của gen nhiễm, để trở thành giống kháng cũng được thảo luận trong bài viết tổng quan này, với những thành công nhất định.

Từ khóa: cAMP (protein kinase A), MAMP: microbe-associated molecular pattern, MAPK (mitogen activated protein kinase), NLR (protein thể nhận có domain NB), PAMP: pathogen-associated molecular pattern, PRR: pattern recognition receptors, PTI: PAMP-triggered immunity.

1. DẪN NHẬP

Cây trồng phát triển những cơ chế tinh vi để chống lại xâm nhiễm pathogen. Thành tựu của hệ gen học (genomics) qua giải trình tự toàn bộ genome; hệ phân tử phiên mã (transcriptomics) qua phổ thể hiện heatmap; hệ protein qua những tương tác rất tinh vi cộng với những thành tựu

của tin sinh học; hệ biến dưỡng (metabolomics) với những cơ chất sơ cấp và thứ cấp; ngân áy hình thành nên một kỷ nguyên mang tên OMICS, giải thích tương tác rất phức tạp giữa ký sinh và ký chủ.

Tính kháng bệnh số lượng QDR (quantitative disease resistance) được điều khiển bởi những QTLs, có ảnh hưởng thứ yếu đến trung bình. Trái lại, tính kháng bệnh định tính (qualitative) là tính kháng

Người phân biên: GS.TS. Vũ Triệu Mân

hoàn toàn, mức độ kháng cao, trên cơ sở điều khiển bởi một gen, có phân bố chuẩn lưỡng cực (bimodal) về tính trạng kháng bệnh (Pilet-Nayel *et al.*, 2017).

Cơ chế phân tử liên quan đến QDR được Gou *et al.* (2023) tổng hợp trong bài viết nổi tiếng trên tạp chí Science. Hệ thống hai lớp (two-tiered system) được thảo luận để phát hiện pathogen của cây chủ. Đó là PTI (pattern triggered immunity) và ETI (effector triggered immunity) (Jones và Dangl, 2006; Zhou và Zhang, 2020; Wang *et al.*, 2022 a).

PTI liên quan đến sự phát hiện pathogen gắn các phân tử MAMPs/PAMPs ở bên ngoài tế bào. (MAMP: microbe-associated molecular pattern; PAMP: pathogen-associated molecular pattern).

MAMPs được định nghĩa là tính chất đặc biệt bảo thủ của pathogen (Bent và Mackey, 2007).

Bên cạnh đó, các phân tử gây tổn thương DAMPs (damage-associated molecular patterns) là những phân tử nội sinh, được phóng thích vào không gian bên ngoài tế bào, khi pathogen xâm nhiễm vào cây chủ. Chúng bao gồm oligogalacturonides (OGs) và ATP ngoại bào (Zipfel 2014).

Thụ thể ghi nhận ở mặt ngoài tế bào PRRs nhận biết phân tử MAMP của pathogen. Sau đó tín hiệu được truyền vào bên trong tế bào, kích hoạt PTI (Couto và Zipfel, 2016).

Lý thuyết hai lớp bảo vệ của Dangl *et al.* (2013) bao gồm PTI và ETI, được mô tả tóm tắt như sau:

PTI (pattern-triggered immunity): miễn dịch khởi động nhờ PAMP) nhận biết từ bên ngoài tế bào của lộ trình truyền

tín hiệu, sản sinh ra ROS (reactive oxygen species), hệ men MAPKs (mitogen-activated protein kinases) và sản sinh dòng chảy calcium (Zipfel *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2019).

ETI (effector triggered immunity): là lớp thứ hai nhận biết được effectors. Pathogens tiết ra một bộ vũ khí proteins của chúng (arsenal of proteins) được gọi là effectors; khi chúng xâm nhiễm vào trong tế bào cây chủ. Chức năng của chúng là tạo điều kiện dễ dàng, tăng cường tiến trình phát sinh bệnh. Có những effectors có thêm vai trò quan trọng để ức chế PTI (Bent và Mackey, 2007).

Ký chủ có những phân tử NLRs (NOD-like receptors hay nucleotide-binding oligomerization domain receptors): là những thụ thể nhận biết được bất cứ effectors nào. Hình thức nhận biết có thể trực tiếp hoặc gián tiếp. Chúng tạo ra phản ứng tự vệ ETI hết sức mạnh mẽ ở trong tế bào.

Effectors của pathogen rất biến thiên giữa các nòi (races) của loài vi sinh gây bệnh nào đó. Phân tử NLR nhận biết được mức độ chuyên tính của nòi (race specific). Phản ứng ETI như vậy thường bao gồm một nội dung lập trình nhanh chóng PCD (programmed cell death: sự chết của tế bào chết được lập trình). Một hệ thống rất phức tạp diễn ra mà thuật ngữ chuyên môn gọi là “defense signaling cascades” (dòng thác truyền tín hiệu tự vệ trên cơ sở phosphoryl hóa) (Dou và Zhou, 2012; Lolle *et al.*, 2020). NLRs ghi nhận effectors theo 3 cách: (1) tương tác giữa

receptor x ligand; (2) tạo bẫy protein để ghi nhận thay đổi của effector; (3) thay đổi của effector tại vùng có độc tố trong tế bào chủ (Dangl *et al.*, 2013).

Cả hai PTI và ETI cùng nhau làm nên hệ thống phòng thủ tổng hợp (Ngou *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021 a, b; Ortiz-Morea *et al.*, 2022).

Mức độ kháng bệnh của cây diễn biến tùy theo sức khỏe cây trồng và điều kiện môi trường. Nếu áp lực chọn lọc yếu, người ta có thể khai thác nhiều cơ chế di truyền phức tạp, trong đó, QDR biểu hiện nhiều ảnh hưởng bản chất bền vững và chuyên tính với nòi (Poland *et al.*, 2009; Nick *et al.*, 2015). Một vài trường hợp, QDR có hiệu quả kháng nhiều bệnh cùng một lúc (Wiesner-Hanks và Nelson, 2016).

Hơn hai thập niên qua, giải trình tự hệ gen phát triển kết hợp với kỹ thuật dòng hóa gen đích, người ta đã phân lập được nhiều gen liên quan đến QDR, phân tích di truyền phân tử. Người ta thảo luận về cơ sở di truyền, cơ chế giải thích QDR trên cơ sở số gen ứng cử viên được dòng hóa thành công, lập bản đồ di truyền dạng liên kết (linkage map) và dạng “association” (GWAS), tất cả đều phục vụ nội dung cải tiến giống kháng bệnh (Roux *et al.*, 2014; Niks *et al.*, 2015; Corwin và Kliebenstein, 2017; Nelson *et al.*, 2018; Crowger và Brown, 2019).

Hiện nay vẫn còn nhiều nội dung chưa rõ giữa tính kháng số lượng và tính kháng định tính, với những mô tả hết sức khác nhau (Gou *et al.*, 2023).

Bài tổng quan này tập trung vào: (1) vai trò của thụ thể NLR; (2) phát hiện effectors của pathogen; (3) ứng dụng metabolites qua kích thích tố sinh trưởng thực vật; (4) khai thác di truyền biểu sinh; (5) chỉnh sửa promoters của gen đích trong cải tiến giống kháng bệnh.

2. TÍNH KHÁNG SỐ LƯỢNG LIÊN QUAN ĐẾN CÁC THỤ THỂ NHẬN BIẾT

Cây trồng nhờ có RLKs (receptor-like kinases) và RLPs (receptor-like proteins) như những thụ thể nhận biết mẫu mực PRRs (pattern recognition receptors:) khi pathogen xâm nhiễm và phát sinh bệnh. Những tín hiệu dẫn đến kích hoạt lớp miễn dịch đầu tiên “PTI” (Boutrot và Zipfel 2017). Những thụ thể nhận biết mẫu mực ấy là proteins thuộc nhiều họ chính, họ phụ khác nhau. Người ta nhận biết chúng nhờ các domains hoặc các motifs. Đó là thụ thể WAKs (wall-associated receptor-like kinases) và WAKLs (WAK-like kinase), LRR (leucine-rich repeat) RLKs và RLPs, lysine motifs (LysM) receptors và lectin-type RLKs (Couto và Zipfel, 2016; Tang *et al.*, 2017; Amsbury, 2020).

Quy trình tự vệ của cây được Gou *et al.* (2023) tóm tắt như sau: (1) nhận biết tín hiệu miễn dịch nhờ PPRs; (2) nhận biết tín hiệu miễn dịch nhờ NLRs; (3) vai trò của tín hiệu trung gian là những kinases; (4) vai trò của yếu tố phiên mã TFs; (5) sinh tổng hợp các chất biên dưỡng sơ cấp và thứ cấp; (6) vai trò của di truyền biểu sinh.

2.1. Những gen QDR thuộc dạng hình WAK/WAKL

WAKs thường có serine/threonine kinase (STK) của dịch bào, EGF của ngoại bào. Chúng gắn với calcium và GUB domain (galacturonan-binding). WAKL thường thiếu domain EGF của ngoại bào so với WAK (Stephens *et al.* 2022). Hệ thống WAK/WAKL được xác định với tần suất lớn từ sự mã hóa của gen mang bản chất “RLK-type QDR” dẫn đến kết quả kháng số lượng (Gou *et al.* 2023). Các gen WAKL được biết là **RFO1** có phổ kháng rộng với các nòi của nấm *Fusarium* gây bệnh trên cây *Arabidopsis* (Diener và Ausubel 2005). Protein WAK1 trong cây *Arabidopsis* gắn kết với **OGs**, mà OGs này là những đoạn phân tử của “pectin polysaccharide homogalacturonan”, hoạt động như DAMPs để kích hoạt miễn dịch thực vật (Anderson *et al.*, 2001; Wagner và Kohorn 2001, Brutus *et al.* 2010).

Trong cây lúa, nhiều protein WAKs có liên quan đến việc điều tiết các gen kháng số lượng đối với bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe oryzae*. Các gen *OsWAK1*, *OsWAK14*, *OsWAK91* và *OsWAK92* điều tiết tích cực tính kháng số lượng. Protein OsWAK112d là một regulator tiêu cực đối với tính kháng bệnh đạo ôn (Li *et al.*, 2009; Delteil *et al.*, 2016).

2.2. Những gen QDR thuộc dạng hình LRR-RLK/RLP

Thụ thể PRRs có chứa domain LRR, bao gồm LRR-RLKs. Bố cục domain LRR ở đầu N và một domain khác

(cytoplasmic STK, LRR-RLPs) có kiến trúc tương tự nhưng thiếu tính chất kinase của dịch bào (Tang *et al.*, 2017). Thụ thể PRRs có domain LRR thường gắn với các proteins hoặc các peptide ligands (tín hiệu bên ngoài khi pathogen xâm nhập).

Trong cây *Arabidopsis*, hệ thống LRR-RLK PRRs FLS2 và EFR nhận biết được flg22 (conserved 22-amino acid epitope) tại đầu N của flagellin vi khuẩn và một elf18 (conserved N-terminal epitope) của EF-Tu (Gomez-Gomez và Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2006). Khi gắn với ligand (pathogen), các thụ thể tiến hành oligomer hóa với những co-receptors khác, tạo ra những receptor tích cực hơn, hoạt hóa lớp bảo vệ đầu tiên là PTI (Tang *et al.*, 2017).

Gen *FLS2* kháng định lượng với vi khuẩn *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* trong cây *Arabidopsis*. Kiểu hình kháng tùy thuộc vào số lượng gen *FLS2* hiện hữu trong hệ gen (Forsyth *et al.*, 2010).

Gen *RFO2* được người ta ghi nhận có tính kháng số lượng với *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthioli* (FOM). Gen mã hóa protein có tính chất tự vệ (guard protein) (Shen và Diener, 2013).

Trong cây bắp, gen *pan1* của dạng hình LRR - RLK nhiễm số lượng đối với bệnh “northern leaf blight” và bệnh héo rũ Stewart (Jaman *et al.*, 2014).

Trong cây bạch dương (*Populus trichocarpa*), hai gen của dạng hình LRR-RLPs kháng số lượng với *Sphaerulina musiva* (Muchero *et al.*, 2018).

2.3. Những gen QDR thuộc dạng hình lectin-RLK

Lectin-RLKs có vai trò kết gắn với những carbohydrates. Người ta chia ra loại hình L, G, và C trên cơ sở “lectin domain” ngoại bào của chúng (Teixeira *et al.*, 2018).

Trong cây *Arabidopsis*, gen *RFO3* mã hóa protein “G-type lectin-RLK” (Cole và Diener, 2013; Teixeira *et al.*, 2018). Kết quả “genome-wide survey” cho thấy: mức độ đa dạng của *RFO3* tương quan thuận chặt chẽ với tính kháng FOM và tính nhiễm (Cole và Diener, 2013).

Trong cây bạch dương *Populus trichocarpa*, kết quả phân tích GWAS, phân tích phân tử transcript và hệ transcriptome cho thấy: loại hình L và G là “lectin-RLKs” có liên quan đến tính kháng số lượng đối với nấm *S. musiva* (Muchero *et al.*, 2018).

3. TÍNH KHÁNG BỆNH SỐ LƯỢNG CÓ LIÊN QUAN THỤ THỂ NLR

Các thụ thể NLR phát hiện ra những effectors của pathogen bên trong tế bào. Chúng lập tức kích hoạt hệ thống ETI. Phản ứng có thể xảy ra bởi hoạt động của PTI cùng một lúc (Ngou *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021; Ortiz - Morea *et al.*, 2022).

Tính kháng do phân tử NLR phát hiện ra pathogen thường rất mạnh mẽ.

Gen *Pb1* mã hóa protein NLR liên quan đến kháng số lượng và kháng bền vững đối với đạo ôn cổ bông do nấm

Magnaporthe grisea trên cây lúa (Hayashi *et al.*, 2010).

Gen *Pi35* liên quan đến tính kháng bền vững nấm *M. oryzae*. Người ta xác định một alen của gen *NLR* điển hình có tên “*Pish*” tương tác alen với *Pi35* làm ra tính kháng bệnh ổn định hơn (Fukuoka *et al.*, 2014).

Trong cây bắp, NLR liên quan đến tính kháng bệnh SCR (southern corn rust) do hai QTLs chủ lực, ***RppCML496*** đóng góp 43 - 78%, ***RppK*** đóng góp 68% biến thiên kiểu hình (Lv *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Deng *et al.*, 2022). Các gen *RppC* và *RppK* của hai QTLs chủ lực nói trên mã hóa protein NLR. Protein ***RppC*** và ***RppK*** có thể là những effectors cùng nguồn gốc AvrRppC và AvrRppK, theo thứ tự, để kích hoạt phản ứng phòng vệ (Chen *et al.*, 2022; Deng *et al.*, 2022). Biến dị di truyền của AvrRppC xác định tính kháng đối với bệnh SCR (Deng *et al.*, 2022). Gen *NLR* của cây bắp có tên *Rcg1* liên quan đến tính kháng bệnh “anthracnose stalk rot” (Broglie *et al.*, 2006).

Trong lúa mạch, gen *Rps7* được xác định là một locus chủ lực điều khiển tính kháng bệnh sọc gỉ sắt lúa mì (wheat stripe rust) (Bettgenhaeuser *et al.*, 2021). Gen *Rps7* đồng phân ly với locus kháng bệnh phấn trắng cây lúa mạch - locus *Mla* - thuộc chùm gen *NLRs* (Wei *et al.*, 2002; Bettgenhaeuser *et al.*, 2021).

Trong cây *Arabidopsis*, cặp gen của *NLR* là *RRS1/RPS4* liên quan đến một QTL kháng vi khuẩn *Xanthomonas campestris* (Debieu *et al.*, 2016).

4. VAI TRÒ CỦA YẾU TỐ PHIÊN MÃ (TFS)

Sau khi nhận biết các tác nhân gây bệnh bởi PRRs và NLRs, một series các thành phần truyền tín hiệu tiến hành hoạt động: bao gồm yếu tố phiên mã TFs, protein kinases,... Chúng thực hiện truyền tín hiệu bằng phosphoryl hóa để đi đến các TPPs (TATA binding proteins) rồi thực hiện phiên mã các gen đích.

4.1. Những yếu tố phiên mã TFs của QDR

Những TFs là thành phần chủ lực trong hệ thống điều tiết sự biểu hiện của gen (Narang *et al.*, 2015); sắp xếp thành chuỗi hoạt động, cho những biểu hiện gen có thứ bậc khác nhau (hierarchical) (Barco và Clay, 2020).

Trong cây lúa, các gen mã hóa TFs là *OsWRKY13* và *C3H12*, điều khiển tính kháng bệnh bạc lá và đạo ôn (Hu *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2012). Protein OsWRKY13 hoạt động như một activator, phụ thuộc vào SA. Protein này đóng vai trò một suppressor trong lộ trình jasmonic acid (JA) (Qiu *et al.*, 2007). Protein C3H12 hoạt động trong lộ trình tín hiệu JA. Tính kháng bệnh bạc lá có liên quan với C3H12 được tích hợp với sự biểu hiện của các gen truyền tín hiệu JA (Deng *et al.*, 2012).

Một alen lặn của yếu tố phiên mã C_2H_2 , tên gọi là *bsr-d1*, điều khiển tính kháng phổ rộng với bệnh đạo ôn. Một nucleotide thay đổi trong vùng promoter của gen *bsr-d1* sẽ làm giảm đi mức độ

biểu hiện gen gắn kết với một TF có tính ức chế MYB, dẫn đến kết quả ức chế phân giải H_2O_2 và làm gia tăng tính kháng bệnh (Li *et al.*, 2017). Gen của yếu tố phiên mã này là *IPAI*. Gen này gây ra hiệu quả QTL bán trội (semidominant) đối với kiến trúc tán cây (Jiao *et al.*, 2010). Gen này còn điều khiển tính kháng bệnh phổ rộng đối với nấm *M. oryzae*. Khi tiến trình phosphoryl hóa xảy ra, sự biểu hiện gen tự vệ sẽ bị kích hoạt (Wang *et al.*, 2018).

4.2. Vai trò kinases

Sự cải biên hậu giải mã, đặc biệt là hiện tượng phosphoryl hóa protein bởi enzyme “cytoplasmic protein kinases” được người ta ghi nhận có vai trò trong kháng bệnh số lượng.

Trong lúa mì, gen *WHEAT KINASE-START 1 (WKS1/Yr36)* điều khiển tính kháng bệnh phổ rộng với các nòi gây bệnh sọc gỉ sắt (stripe rust) lúa mì.

Trong Arabidopsis, gen *Resistance-related KinaSe 1 (RKS1)* điều khiển tính kháng bệnh do vi khuẩn *Xanthomonas campestris* (Fu *et al.*, 2009; Huard-Chauveau *et al.*, 2013).

WKS1 nhắm mục tiêu đến lục lạp, nơi đó, nó tiến hành phosphoryl hóa enzyme “thylakoid-associated ascorbate peroxidase” (Gou *et al.*, 2015). Phản ứng phosphoryl hóa qua trung gian WKS1/Yr36 của PsbO dẫn đến quang tổng hợp suy giảm và sự tăng trưởng của *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* giảm đi ở lá (Wang *et al.*, 2019).

Protein WHEAT TANDEM KINASE 2 (WTK2) được mã hóa bởi locus *Sr60*.

Protein này sở hữu 2 domains giả định mang tên “kinase”, điều khiển tính kháng không hoàn toàn với bệnh gỉ sắt trên chồi thân lúa mì (Chen *et al.*, 2020). Gen *TaPsIPK1* mã hóa protein đóng vai enzyme có tên là “receptor-like cytoplasmic kinase”. Gen này được xác định là gen nhiễm (S) đối với bệnh “stripe rust” do nấm *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Nếu làm bất hoạt gen *TaPsIPK1* sẽ dẫn đến kết quả tính kháng phổ rộng đối với pathogen gây bệnh gỉ sắt (Wang *et al.*, 2022b).

Trong cây lúa, gen thuộc loại hình **MAPK** như vậy có tên là ***OsMPK6***. Đó là QTL thứ yếu điều khiển tính kháng bệnh đạo ôn, bệnh bạc lá (Yuan *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008).

Kết quả từ nhiều nguồn nghiên cứu cho thấy, chức năng của MAPKs trong hệ thống cascade truyền tín hiệu bao gồm ít nhất 3 thành phần, đó là: MAP kinase kinase kinase (MAPKKK hoặc MEKKs), MAP kinase kinase (MAPKK hoặc MEKs) và MAPK.

MAPK nhắm đến đích nhiều proteins, đối với hoạt động khá rộng của các thành phần tín hiệu tại downstream (Rodriguez *et al.*, 2010; Devendrakumar *et al.*, 2018).

5. PHYTOHORMONES VÀ CHỨC NĂNG CỦA METABOLOMICS

Phytohormones là hợp chất có phân tử nhỏ điều tiết các tiến trình sinh vật, sản sinh ra những cơ chế biến dưỡng (metabolites), thông qua tương tác với các

protein thụ thể (Davies, 2004). Người ta ghi nhận hầu hết các phytohormones, bao gồm JA, SA, ethylene (ET), abscisic acid (ABA), auxin, gibberellins (GAs), cytokinins (CKs), và brassinosteroids (BRs), có liên quan đến tự vệ của cây trồng (Shigenaga và Argueso, 2016; Berens *et al.*, 2017). Trong số đó, các gen liên quan đến **auxin**, **SA** và **JA** được người ta ghi nhận có liên quan đến tính kháng bền vững với pathogen. Gen mã hóa auxin có tính chất số lượng.

Gen *GH3-8* mã hóa “indole-3-acetic acid-amino synthase” liên quan đến một QTL điều khiển tính kháng bệnh đạo ôn lúa (Wen *et al.*, 2003). Gen *GH3-8* biểu hiện mạnh mẽ trong cây lúa sẽ dẫn đến kết quả tính kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Tính kháng được tăng lên như vậy có thể do kết quả ức chế sự biểu hiện của gen *expansin* với tín hiệu auxin bị ức chế (Ding *et al.*, 2008). Tương tự, gen *GH3-2*, mã hóa một protein với 82% trình tự giống như *GH3-8* liên quan đến một QTL thứ yếu. Nó điều khiển tính kháng phổ rộng với bệnh bạc lá, bệnh sọc trong vi khuẩn và bệnh đạo ôn lúa (Fu *et al.*, 2011).

Trong cây bắp, gen *GH3-8* liên quan đến một QTL thứ yếu có tên là *qRfg2*, gắn liền với tính kháng bệnh thối thân “*Gibberella* stalk rot”, mã hóa protein “plastid stroma-localized auxin” *ZmAuxRP1* (Ye *et al.* 2019). Gen *ZmAuxRP1* được điều tiết theo kiểu “down” sau khi pathogen xâm nhiễm, làm giảm sinh tổng hợp “indole-3-acetic acid”

(IAA). Trong khi đó, nó làm tăng cường hoạt động tích tụ benzoxazinoid, làm tăng tính kháng với “*Gibberella stalk rot*” và “*Fusarium ear rot*” (Ye *et al.*, 2019).

Hai nghiên cứu điển hình nói trên dẫn đến luận điểm “sinh tổng hợp auxin” và “truyền tín hiệu” có tương quan nghịch với tính kháng bệnh. Đó là những nghiên cứu liên quan đến cây trồng *Physcomitrella patens*, *Brassica rapa*, *Arabidopsis*, đậu nành, lúa mì (Ishikawa *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Mutka *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014; Lavy *et al.*, 2016; Berens *et al.*, 2017).

Salicylic acid là hormone bảo vệ cây. Chúng tăng cường khả năng miễn dịch chống lại các pathogen có bản chất sinh dưỡng (biotrophic) và bán sinh dưỡng (hemi-biotrophic) (Peng *et al.*, 2021).

Gen của cây lúa *STVII* kháng bệnh “rice stripe virus” (RSV) (Zhang *et al.*, 2011). Gen này mã hóa enzyme “sulphotransferase” chuyển đổi SA thành sulphonated SA (SSA). SSA đóng vai trò như một tín hiệu để kích hoạt tổng hợp SA. Cả hai SA và SSA đều có thể kích hoạt phản ứng tự vệ của cây chống lại RSV (Wang *et al.*, 2014).

Protein có tên là “CCCH - type zinc finger protein C3H12” điều tiết tích cực theo hướng định lượng tính kháng bệnh bạc lá thông qua lộ trình truyền tín hiệu JA (Deng *et al.*, 2012).

Salicylic acid và **auxin** truyền tín hiệu như biểu hiện đối kháng trong kết quả điều tiết bảo vệ cây trồng. Mặt khác,

SA gây ra ức chế diện rộng các gen có liên quan đến auxin và ổn định phân tử ức chế “auxin-response repressor” *AUXIN RESISTANT 2 (AXR2)*, do vậy, ức chế luôn các phản ứng auxin (Wang *et al.*, 2007). Tín hiệu auxin còn ức chế mức độ của hàm lượng SA và tín hiệu SA. Người ta thấy rằng microRNA “**miR393**” ức chế tín hiệu auxin bởi hướng đến mRNAs của thụ thể có tên là *TIR1/AFB* auxin receptors, ngăn cản nó thực hiện tính đối kháng với truyền tín hiệu SA (Robert - Seilaniantz *et al.*, 2011). Truyền tín hiệu auxin thông qua trung gian *AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF7)* sẽ đối kháng với tín hiệu SA để kiểm soát sự xâm nhiễm của vi khuẩn thông qua điều tiết hệ rễ ngang phát triển (Kong *et al.*, 2020). Mối quan hệ đối kháng như vậy giữa SA và auxin có thể là một chiến lược được sử dụng để giữ cân bằng giữa sự phát triển và sự tự vệ của cây (Gou *et al.*, 2023).

6. DI TRUYỀN BIỂU SINH & TÍNH KHÁNG BỆNH

Cơ chế di truyền biểu sinh (epigenetics) đóng góp trực tiếp vào bộ nhớ miễn dịch cây trồng và ảnh hưởng đến tính kháng bệnh của cây (Ramirez - Prado *et al.*, 2018; Parker *et al.*, 2022).

Trong cây bắp, gen *ZmCCT*, định vị tại locus *qRfg1* điều khiển tính kháng bệnh thối thân do “*Gibberella*”. Nguyên tố chuyển vị CACTA định vị tại upstream của gen *ZmCCT* ức chế sự thể

hiện của “*ZmCCT*” kích hoạt pathogen, dẫn đến cây nhiễm bệnh (Wang *et al.*, 2017). Sự điều tiết hết sức tinh tế của di truyền biểu sinh đối với hệ thống truyền tín hiệu tự vệ, hoạt động thăm dò trong tự vệ cây trồng (Zhi và Chang, 2021; Parker *et al.*, 2022).

Phân tử micro RNA có độ lớn 20 - 24 nucleotides, không mật mã di truyền, có vai trò quan trọng trong tương tác giữa cây chủ và môi trường.

Nhiều phân tử microRNAs (miRNAs) được tìm thấy có chức năng điều tiết hệ miễn dịch của cây lúa kháng bệnh đạo ôn phổ rộng (Li *et al.*, 2021). Người ta ít hiểu biết về miRNAs trực tiếp điều khiển gen kháng (*R*) trong miễn dịch học cây lúa. Li *et al.* (2021) đã tiến hành giải trình tự, thành lập thư viện RNA quy mô nhỏ, từ cây mạ ở tuổi 4 lá của giống lúa kháng đạo ôn Ziyu44 và giống nhiễm bệnh Jiangnanxiangnuo (JNXN); cho lây nhiễm nhân tạo nguồn nấm *Magnaporthe oryzae*. Người ta thấy số lượng phân tử miRNAs tăng gấp nhiều lần trong giống kháng Ziyu44 so với giống nhiễm JNXN. Người ta tập trung nghiên cứu phân tử miR9664. Kết quả chạy trình tự cho thấy nó điều tiết theo kiểu “up” trong giống lúa Ziyu44 và điều tiết mạnh mẽ hơn trong giống lúa JNXN vào thời điểm 24 - 48 giờ sau khi chủng nấm bệnh (hpi). Hầu hết các phân tử miR9664 được phát hiện dự đoán gen đích đều suy giảm trong dòng lúa *miR9664-oe* và tăng lên trong dòng lúa *miR9664-m* lines. Vị trí phân cắt của gen đích *LOC_Os08g07774* được xác định bởi

công cụ RLM-RACE. Kết quả cho thấy gen kháng *R* qua trung gian *miR9664* đóng góp đáng kể tính kháng phổ rộng của Ziyu44 đối với bệnh đạo ôn. Người ta xác định đó là một miRNA mới trong cây lúa với đích đến của các gen *R* điều tiết hoạt động miễn dịch của cây đối với nấm gây bệnh đạo ôn, góp phần quan trọng trong giải thích tương tác giữa ký sinh và ký chủ (Li *et al.*, 2021).

Trong cây khoai tây, phân tử microRNAs có vai trò quan trọng trong hệ thống phòng thủ cục bộ tại nơi bị xâm nhiễm và tạo ra hệ thống kích kháng tại những mô cách xa đó (systemic acquired resistance: SAR) (Natarajan *et al.*, 2023). Tương tác giữa khoai tây và nấm gây bệnh *Phytophthora infestans* được nghiên cứu thông qua miR160 xâm nhiễm tại chỗ và phản ứng SAR. Sự biểu hiện mạnh mẽ gen miR160 và kết quả knockdown đều cho kết quả làm tăng tính nhiễm bệnh. Như vậy, mức biểu hiện miR160 tương đương với cây wild-type: cần thiết cho phòng thủ tại chỗ. Khi tiến hành knockdown phân tử miR160; không thể kích hoạt được SAR. Như vậy, miR160 rất cần thiết cho cả phản ứng miễn dịch tại chỗ và SAR. Phân tử miR160 tạo ra tương tác giữa tự vệ nhờ salicylic acid và lộ trình tăng trưởng nhờ auxin. Như vậy, miR160 có vai trò cực kỳ quan trọng trong tự vệ tại chỗ bị xâm nhiễm (local) và phản ứng SAR trong suốt tiến trình tương tác giữa cây khoai tây với nấm *P. infestans* (Natarajan *et al.*, 2023).

Trong cây sắn, pathogens của bệnh vi khuẩn bạc lá *Xanthomonas phaseoli*

pv. manihotis dựa vào sự biểu hiện gen nhiễm (S) của cây chủ để tăng cường phát sinh bệnh trên cây sắn. Khi methyl hóa phân tử DNA diễn ra, có sự cải biên mang tính chất di truyền biểu sinh ảnh hưởng mạnh mẽ đến biểu hiện gen đích, khóa lại sự tiếp cận gen S thông qua methyl hóa có chủ đích ấy (Natarajan *et al.*, 2018). Kết quả dẫn đến tính kháng bệnh tăng lên resistance. Đây là kết quả nghiên cứu “epigenome editing” rất hữu ích phục vụ cải tiến giống sắn cao sản, kháng được bệnh CBB (Natarajan *et al.*, 2018).

Trong cây táo, những effectors có vai trò quan trọng trong sự xâm nhiễm của nấm gây bệnh ghẻ trái táo (Xu *et al.*, 2023). Tuy nhiên, cơ chế điều tiết sự biểu hiện gen “effector” chưa rõ ràng, đặc biệt là mức độ sau khi phiên mã. Xu *et al.* (2023) phát hiện ra sự kiện điều tiết hậu phiên mã của gen “effector” có tên là *VmSP1* nhờ phân tử miRNA-like RNA (*Vm-milR16*). Nó làm dễ dàng cho sự xâm nhiễm bệnh của nấm gây “*Valsa canker*” trên cây táo; nấm có tên là *Valsa mali*. Sự biểu hiện gen *VmSP1* có thể bị ức chế bởi phân tử miRNA có tên là *Vm-milR16* theo kết quả chạy trình tự đặc biệt. Khi nấm *V. mali* xâm nhiễm, *Vm-milR16* điều tiết theo kiểu “down”, trong khi đó, gen *VmSP1* điều tiết theo kiểu “up”. *VmSP1* được xem như là protein được tiết ra để ức chế miễn dịch của cây táo. Làm mất đi gen *VmSP1* sẽ không ảnh hưởng đến tăng trưởng sinh thực nhưng làm giảm đáng kể độc tính của nấm *V. mali*. Protein *VmSP1* có thể tương tác với yếu tố phiên

mã MdbHLH189 trong cây táo. Đây là kết quả điều tiết theo mô hình epigenetic mới được phát hiện của gen “effector” liên kết với độc tính của bệnh qua trung gian phân tử miRNA của nấm tại thời điểm sau phiên mã. Kết quả minh chứng được chức năng và cơ chế hoạt động của những effectors của nấm gây bệnh cây trồng (Xu *et al.*, 2023).

7. CHỈNH SỬA HỆ GEN NHẪM MỤC TIÊU KHÁNG BỆNH

SWEET là họ gen đặc biệt trong thực vật bậc cao, có chức năng đa dạng, bao gồm tương tác giữa ký chủ và ký sinh.

Trong cây lúa, bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (*Xoo*), tiết ra protein gây độc của nó từ một đến sáu TALEs (transcription-activator-like effectors) kết gắn tại trình tự promoter đặc biệt tại những gen chủ đích như *SWEET11*, *SWEET13* và *SWEET14*, biểu hiện nhiễm bệnh. Oliva *et al.* (2023) tiến hành sử dụng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR-Cas9 tạo ra đột biến có chủ đích tại promoter của 3 gen *SWEET* nói trên. Chỉnh sửa gen như vậy được theo dõi thông qua kết quả phân tích trình tự DNA của gen TALEs của 63 chủng nòi *Xoo*, biểu hiện đa biến thể TALEs đối với alen *SWEET13*. Các đột biến còn tạo ra *SWEET14*, cũng là đích đến bởi hai TALEs từ một chủng nòi thu thập từ châu Phi “*Xoo lineage*”. Có tất cả 5 đột biến trong dòng lúa Kitaake và giống lúa mega IR64, giống lúa Ciharang-Sub1. Kết quả thanh lọc bệnh trên đồng ruộng cho thấy

SWEET promoters được chỉnh sửa có ảnh hưởng kháng bệnh bạc lá, phổ kháng rộng (Oliva *et al.*, 2023).

Trong cây lúa, Ni *et al.* (2021) tiến hành nghiên cứu hai loài vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây bạc lá và *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) gây bệnh sọc trong (bacterial leaf streak). *Xoo* xâm nhiễm cây lúa chủ yếu dựa vào TALEs (transcription activator-like effectors). Protein “effector” này có tên là **EBEs** (effector binding elements), kích hoạt sự biểu hiện của gen nhiễm ở downstream. Khóa lại TALE gắn kết với EBE có thể làm tăng tính kháng bệnh với *Xoo* tương thích (Ni *et al.*, 2021). Họ sử dụng CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa *EBEs* của 3 gen chủ lực gây nhiễm bệnh (*OsSWEET11*, *OsSWEET14* và *OsSULTR3;6*) trong giống lúa Guihong 1 và Zhonghua 11. Cả hai giống này đều có đột biến tự nhiên cùng một cơ sở giống nhau tại EBE của giống nhiễm khác có tên là *OsSWEET13*. *OsSWEET13* không bị kích hoạt bởi TALE. Hai dòng lúa GT0105 (dẫn xuất từ Guihong 1) và ZT0918 (dẫn xuất từ Zhonghua 11) có đột biến chủ đích và **transgene-free** được người ta thu thập; biểu hiện được tính kháng có ý nghĩa đối với cả hai vi khuẩn *Xoo* strains và *Xoc* strains. Đây là báo cáo đầu tiên về cây lúa chỉnh sửa gen tại vùng đích promoters của gen nhiễm, để trở thành giống kháng *Xoo* và *Xoc*, mà tính trạng nông học cần thiết không hề thay đổi (Ni *et al.*, 2021).

8. KẾT LUẬN

Các tư liệu được cập nhật cho đến tháng 5 năm 2023 về giống cây trồng kháng bệnh, đã phác họa một chặng đường mới: ứng dụng *OMICS* trong cải tiến giống cây trồng kháng bệnh. Mục tiêu: phổ kháng rộng, kháng bền vững đã được thảo luận thông qua ký chủ, ký sinh và môi trường:

1. Tiến trình phát sinh bệnh bao gồm phản ứng của cây chủ, phản ứng của pathogen, kết hợp với sự kiện “đồng tiến hóa” vô cùng phức tạp [tương tác ký chủ & ký sinh].

2. Pathogen tích cực cạnh tranh với microbiome trên lá, trong thân, rễ lúa, đồng thời tích cực tiến hóa thông qua effectors của chúng.

3. Các tiến trình phát triển và biến dưỡng của cây lúa không phải chỉ phát hiện pathogen trực tiếp, mà còn tham gia phản ứng tự vệ, tiến hành cơ chế đánh thức hệ thống kháng bệnh theo số lượng, thông qua lộ trình truyền tín hiệu hết sức tinh tế.

4. Trong chiến lược nghiên cứu, người ta quan tâm đến nội dung cải tiến “đánh giá kiểu hình” sao cho chính xác hơn; phát triển phương pháp “đánh giá kiểu gen” hiệu quả hơn nhờ thành tựu của công cụ *OMICS* mà công cụ mới nhất là “metabolomics”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amsbury, S. (2020). Sensing attack: The role of wall-associated kinases in plant pathogen responses. *Plant Physiol.* 183: 1420 - 1421.

2. Anderson, C.M., Wagner, T.A., Perret, M., He, Z.H., He, D., and Kohorn, B.D. (2001). WAKs: Cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol. Biol.* 47: 197 - 206.
3. Barco, B., and Clay, N.K. (2020). Hierarchical and dynamic regulation of defense-responsive specialized metabolism by WRKY and MYB transcription factors. *Front. Plant Sci.* 10: 1775.
4. Bent, A.F., and Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 399 - 436.
5. Berens, M.L., Berry, H.M., Mine, A., Argueso, C.T., and Tsuda, K. (2017). Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 401 - 425.
6. Bettgenhaeuser, J., Hernández-Pinzón, I., Dawson, A.M., Gardiner, M., Green, P., Taylor, J., Smoker, M., Ferguson, J.N., Emmrich, P., Hubbard, A., Bayles, R., Waugh, R., Steffenson, B.J., Wulff, B., Dreiseitl, A., Ward, E.R., and Moscou, M.J. (2021). The barley immune receptor Mla recognizes multiple pathogens and contributes to host range dynamics. *Nat. Commun.* 12: 6915.
7. Boutrot, F., and Zipfel, C. (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad - spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 257 - 286.
8. Broglie, K., Butler, K., Butruille, M., Da Silva Conceicao, A., Frey, T., Hawk, J., Jaqueth, J., Jones, E., Multani, D., and Wolters, P. (2006). Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. US patent No. 20060397247.
9. Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 9452 - 9457.
10. Chen, G., Zhang, B., Ding, J., Wang, H., Deng, C., Wang, J., Yang, Q., Pi, Q., Zhang, R., Zhai, H., Dong, J., Huang, J., Hou, J., Wu, J., Que, J., Zhang, F., Li, W., Min, H., Tabor, G., Li, B., Liu, X., Zhao, J., Yan, J., and Lai, Z. (2022). Cloning southern corn rust resistant gene *RppK* and its cognate gene *AvrRppK* from *Puccinia polysora*. *Nat. Commun.* 13: 4392.
11. Chen, S., Rouse, M.N., Zhang, W., Zhang, X., Guo, Y., Briggs, J., and Dubcovsky, J. (2020). Wheat gene *Sr60* encodes a protein with two putative kinase domains that confers resistance to stem rust. *New Phytol.* 225: 948 - 959.
12. Cole, S.J., and Diener, A.C. (2013). Diversity in receptor-like kinase genes is a major determinant of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthioli*. *New Phytol.* 200: 172 - 184.
13. Corwin, J.A., and Kliebenstein, D.J. (2017). Quantitative resistance: More than just perception of a pathogen. *Plant Cell* 29: 655 - 665.
14. Couto, D., and Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* 16: 537 - 552.
15. Cowger, C., and Brown, J.K.M. (2019). Durability of quantitative resistance in crops: Greater than we know? *Annu. Rev. Phytopathol.* 57: 253 - 277.
16. Dangl, J.L., Horvath D.M., Staskawicz B.J. (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341(6147): 746 - 51.
17. Davies, P. (2004). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, 3rd ed (Dordrecht: Kluwer Academic).
18. Debieu, M., Huard-Chauveau, C., Genissel, A., Roux, F., and Roby, D. (2016). Quantitative disease resistance to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* involves an *Arabidopsis* immune receptor pair and a gene of unknown function. *Mol. Plant Pathol.* 17: 510 - 520.
19. Delteil, A., Gobbato, E., Cayrol, B., Estevan, J., Michel-Romiti, C., Dievart, A., Kroj, T.,

- and Morel, J.B. (2016). Several wall-associated kinases participate positively and negatively in basal defense against rice blast fungus. *BMC Plant Biol.* 16: 17.
20. Deng, C., Leonard, A., Cahill, J., Lv, M., Li, Y., Thatcher, S., Li, X., Zhao, X., Du, W., Li, Z., Li, H., Llaca, V., Fengler, K., Marshall, L., Harris, C., Tabor, G., Li, Z., Tian, Z., Yang, Q., Chen, Y., Tang, J., Wang, X., Hao, J., Yan, J., Lai, Z., Fei, X., Song, W., Lai, J., Zhang, X., Shu, G., Wang, Y., Chang, Y., Zhu, W., Xiong, W., Sun, J., Li, B., and Ding, J. (2022). The RppC - AvrRppC NLR - effector interaction mediates the resistance to southern corn rust in maize. *Mol. Plant* 15: 904 - 912.
 21. Deng, H.Q., Liu, H.B., Li, X.H., Xiao, J.H., and Wang, S.P. (2012). A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease. *Plant Physiol.* 158: 876 - 889.
 22. Devendrakumar, K.T., Li, X., and Zhang, Y.L. (2018). MAP kinase signalling: Interplays between plant PAMP - and effector-triggered immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 75: 2981 - 2989.
 23. Diener, A.C., and Ausubel, F.M. (2005). *RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 1*, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* 171: 305 - 321.
 24. Ding, X.H., Cao, Y.L., Huang, L.L., Zhao, J., Xu, C.G., Li, X.H., and Wang, S.P. (2008). Activation of the indole-3-acetic acid-amino synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate - and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell* 20: 228 - 240.
 25. Dou, D., and Zhou, J.M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: Different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe* 12: 484 - 495.
 26. Forsyth, A., Mansfield, J.W., Grabov, N., de Torres, M., Sinapidou, E., and Grant, M.R. (2010). Genetic dissection of basal resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in accessions of *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 1545 - 1552.
 27. Fu, D.L., Uauy, C., Distelfeld, A., Blechl, A., Epstein, L., Chen, X.M., Sela, H.A., Fahima, T., and Dubcovsky, J. (2009). A Kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323: 1357 - 1360.
 28. Fu, J., Liu, H., Li, Y., Yu, H., Li, X., Xiao, J., and Wang, S. (2011). Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiol.* 155: 589 - 602.
 29. Fukuoka, S., Yamamoto, S. - I., Mizobuchi, R., Yamanouchi, U., Ono, K., Kitazawa, N., Yasuda, N., Fujita, Y., Thi Thanh Nguyen, T., Koizumi, S., Sugimoto, K., Matsumoto, T., and Yano, M. (2014). Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Sci. Rep.* 4: 4550.
 30. Gomez - Gomez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5: 1003 - 1011.
 31. Gou, J.Y., Li, K., Wu, K.T., Wang, X.D., Lin, H.Q., Cantu, D., Uauy, C., Dobon-Alonso, A., Midorikawa, T., Inoue, K., Sanchez, J., Fu, D.L., Blechl, A., Wallington, E., Fahima, T., Meeta, M., Epstein, L., and Dubcovsky, J. (2015). Wheat stripe rust resistance protein WKS1 reduces the ability of the thylakoid - associated ascorbate peroxidase to detoxify reactive oxygen species. *Plant Cell* 27: 1755 - 1770.
 32. Gou, M., Balint-Kurti, P., Xu ML., and Yang Q. (2023). Quantitative disease resistance: Multifaceted players in plant defense. *Journal of Integrative Plant Biology* 65: 594 - 610.
 33. Hayashi, N., Inoue, H., Kato, T., Funao, T., Shirota, M., Shimizu, T., Kanamori, H., Yamane, H., Hayano-Saito, Y., Matsumoto, T., Yano, M., and Takatsuji, H. (2010). Durable panicle blast-resistance gene *Pbl* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *Plant J.* 64: 498 - 510.

34. Hu, K.M., Qiu, D.Y., Shen, X.L., Li, X.H., and Wang, S.P. (2008). Isolation and manipulation of quantitative trait loci for disease resistance in rice using a candidate gene approach. *Mol. Plant* 1: 786 - 793.
35. Huard-Chauveau, C., Perchepped, L., Debieu, M., Rivas, S., Kroj, T., Kars, I., Bergelson, J., Roux, F., and Roby, D. (2013). An atypical kinase under balancing selection confers broad-spectrum disease resistance in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 9: e1003766.
36. Ishikawa, T., Okazaki, K., Kuroda, H., Itoh, k, Mitsui, T., and Hori, H. (2007). Molecular cloning of *Brassica rapa* nitrilases and their expression during clubroot development. *Mol. Plant Pathol.* 8: 623 - 637.
37. Jamann, T.M., Poland, J.A., Kolkman, J.M., Smith, L.G., and Nelson, R.J. (2014). Unraveling genomic complexity at a quantitative disease resistance locus in maize. *Genetics* 198: 333 - 344.
38. Jiao, Y., Wang, Y., Xue, D., Wang, J., Yan, M., Liu, G., Dong, G., Zeng, D., Lu, Z., Zhu, X., Qian, Q., and Li, J. (2010). Regulation of *OsSPL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice. *Nat. Genet.* 42: 541 - 544.
39. Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323 - 329.
40. Kong, X., Zhang, C., Zheng, H., Sun, M., Zhang, F., Zhang, M., Cui, F., Lv, D., Liu, L., Guo, S., Zhang, Y., Yuan, X., Zhao, S., Tian, H., and Ding, Z. (2020). Antagonistic interaction between auxin and SA signaling pathways regulates bacterial infection through lateral root in *Arabidopsis*. *Cell Rep.* 32: 108060.
41. Lavy, M., Prigge, M.J., Tao, S., Shain, S., Kuo, A., Kirchsteiger, K., and Estelle, M. (2016). Constitutive auxin response in *Physcomitrella* reveals complex interactions between Aux/IAA and ARF proteins. *eLife* 5: e13325.
42. Li, H., Zhou, S.Y., Zhao, W.S., Su, S.C., and Peng, Y.L. (2009). A novel wall - associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 69: 337 - 346.
43. Li, J., Zhang, H., Yang, R., Zeng, Q.C.; Han, GY., Du, YL., Yang, Y., Yang, GH and Luo, Q. (2021). Identification of miRNAs Contributing to the Broad-Spectrum and Durable Blast Resistance in the Yunnan Local Rice Germplasm. *Frontiers in Plant Science: Vol. 12* (749919)
44. Li, W., Zhu, Z., Chern, M., Yin, J., Yang, C., Ran, L., Cheng, M., He, M., Wang, K., Wang, J., Zhou, X., Zhu, X., Chen, Z., Wang, J., Zhao, W., Ma, B., Qin, P., Chen, W., Wang, Y., Liu, J., Wang, W., Wu, X., Li, P., Wang, J., Zhu, L., Li, S., and Chen, X. (2017). A natural allele of a transcription factor in rice confers broad - spectrum blast resistance. *Cell* 170: 114 - 126.
45. Lolle, S., Stevens, D., and Coaker, G. (2020). Plant NLR-triggered immunity: From receptor activation to downstream signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 62: 99 - 105.
46. Lv, M., Deng, C., Li, X., Zhao, X., Li, H., Li, Z., Tian, Z., Leonard, A., Jaqueth, J., Li, B., Hao, J., Chang, Y., and Ding, J. (2021). Identification and fine - mapping of *RppCML496*, a major QTL for resistance to *Puccinia polysora* in maize. *Plant Genome* 14: e20062.
47. Muchero, W., Sondreli, K.L., Chen, J.G., Urbanowicz, B.R., Zhang, J., Singan, V., Yang, Y., Brueggeman, R.S., Franco - Coronado, J., Abraham, N., Yang, J.Y., Moremen, K.W., Weisberg, A.J., Chang, J.H., Lindquist, E., Barry, K., Ranjan, P., Jawdy, S., Schmutz, J., Tuskan, G.A., and LeBoldus, J.M. (2018). Association mapping, transcriptomics, and transient expression identify candidate genes mediating plant - pathogen interactions in a tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115: 11573 - 11578.
48. Mutka, A.M., Fawley, S., Tsao, T., and Kunkel, B.N. (2013). Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid - mediated defenses. *Plant J.* 74: 746 - 754.

49. Narang, V., Ramli, M.A., Singhal, A., Kumar, P., de Libero, G., Poidinger, M., and Monterola, C. (2015). Automated identification of core regulatory genes in human gene regulatory networks. *PLoS Comput. Biol.* 11: e1004504.
50. Natarajan, B., Kalsi, HS., Godbole, P., Malankar, N., Thiagarayaselvam, A., Siddappa, S., Thulasiram, HV., Chakrabarti, SK., Banerjee, AK. (2018) miRNA160 is associated with local defense and systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, 69 (8): 2023 - 2036
51. Nelson, R., Wiesner - Hanks, T., Wissner, R., and Balint - Kurti, P. (2018). Navigating complexity to breed disease - resistant crops. *Nat. Rev. Genet.* 19: 21 - 33.
52. Ngou, B.P.M., Ahn, H.K., Ding, P.T., and Jones, J.D.G. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592: 110 - 115.
53. Ni, Z., Cao, Y., Jin, X., Fu, Z., Li, J., Mo, X., He, Y., Tang, J., Huang, S. (2021). Engineering Resistance to Bacterial Blight and Bacterial Leaf Streak in Rice. *Rice (N Y)*. 14(1): 38.
54. Niks, R.E., Qi, X., and Marcel, T.C. (2015). Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: Concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53: 445 - 470.
55. Oliva, R., Ji, C., Atienza-Grande, G., Huguet-Tapia, JC., Perez-Quintero, A., Li, T., Joon-Seob Eom, Li, C., Nguyen, H., Liu, B., Auguy, F., Sciallano, C., Van T. Luu, Dossa, GS., Cunnac, S., Schmidt, SM., Slamet - Loedin, IH., Vera Cruz, C., Szurek, B., Frommer, WB., White, FF., Yang, B. (2023). Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nature Biotechnology* 37: 1344 - 1350.
56. Ortiz-Morea, F.A., Liu, J., Shan, L., and He, P. (2022). Malectin - like receptor kinases as protector deities in plant immunity. *Nat. Plants* 8: 27 - 37.
57. Parker, A.H., Wilkinson, S.W., and Ton, J. (2022). Epigenetics: A catalyst of plant immunity against pathogens. *New Phytol.* 233: 66 - 83.
58. Peng, Y., Yang, J., Li, X., and Zhang, Y. (2021). Salicylic acid: Biosynthesis and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 72: 761 - 791.
59. Pilet-Nayel, M.L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.C., Fournet, S., Durel, C.E., and Delourme R. (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Front. Plant Sci.* 8: 1838.
60. Pilet-Nayel, M.L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.C., Fournet, S., Durel, C.E., and Delourme, R. (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Front. Plant Sci.* 8: 1838.
61. Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wissner, R.J., Pratt, R.C., and Nelson, R.J. (2009). Shades of gray: The world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14: 21 - 29.
62. Qiu, D.Y., Xiao, J., Ding, X.H., Xiong, M., Cai, M., Cao, C.L., Li, X.H., Xu, C.G., and Wang, S.P. (2007). OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense - related genes in salicylate - and jasmonate - dependent signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 492 - 499.
63. Qiu, D.Y., Xiao, J., Ding, X.H., Xiong, M., Cai, M., Cao, C.L., Li, X.H., Xu, C.G., and Wang, S.P. (2007). OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense - related genes in salicylate - and jasmonate - dependent signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 492 - 499.
64. Ramirez-Prado, J.S., Abulfaraj, A.A., Rayapuram, N., Benhamed, M., and Hirt, H. (2018). Plant immunity: From signaling to epigenetic control of defense. *Trends Plant Sci.* 23: 833 - 844.
65. Robert-Seilaniantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., and Jones, J.D.G. (2011). The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant J.* 67: 218 - 231.
66. Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., and Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 621 - 649.
67. Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., and Raffaele, S. (2014). Resistance to

- phytopathogens *e tutti quanti*: Placing plant quantitative disease resistance on the map. *Mol. Plant Pathol.* 15: 427 - 432.
68. Shen, Y., and Diener, A.C. (2013). *Arabidopsis thaliana* RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 2 implicates tyrosine-sulfated peptide signaling in susceptibility and resistance to root infection. *PLoS Genet.* 9: e1003525.
 69. Shen, Y., and Diener, A.C. (2013). *Arabidopsis thaliana* RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 2 implicates tyrosine-sulfated peptide signaling in susceptibility and resistance to root infection. *PLoS Genet.* 9: e1003525.
 70. Shigenaga, A.M., and Argueso, C.T. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* 56: 174 - 189.
 71. Stephens, C., Hammond-Kosack, K.E., and Kanyuka, K. (2022). WAKsing plant immunity, waning diseases. *J. Exp. Bot.* 73: 22 - 37.
 72. Stephens, C., Hammond-Kosack, K.E., and Kanyuka, K. (2022). WAKsing plant immunity, waning diseases. *J. Exp. Bot.* 73: 22 - 37.
 73. Tang, D., Wang, G., and Zhou, J.M. (2017). Receptor kinases in plant-pathogen interactions: More than pattern recognition. *Plant Cell* 29: 618 - 637.
 74. Teixeira, M.A., Rajewski, A., He, J., Castaneda, O.G., Litt, A., and Kaloshian, I. (2018). Classification and phylogenetic analyses of the *Arabidopsis* and tomato G-type lectin receptor kinases. *BMC Genomics* 19: 239.
 75. Tian, W., Hou, C., Ren, Z., Wang, C., Zhao, F., Dahlbeck, D., Hu, S., Zhang, L., Niu, Q., Li, L., Staskawicz, B.J., and Luan, S. (2019). A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature* 572: 131 - 135.
 76. Wagner, T.A., and Kohorn, B.D. (2001). Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* 13: 303 - 318.
 77. Wang, C., Yang, Q., Wang, W., Li, Y., Guo, Y., Zhang, D., Ma, X., Song, W., Zhao, J., and Xu, M. (2017). A transposon - directed epigenetic change in *ZmCCT* underlies quantitative resistance to *Gibberella* stalk rot in maize. *New Phytol.* 215: 1503 - 1515.
 78. Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., and Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* 17: 1784 - 1790.
 79. Wang, H., Wijeratne, A., Wijeratne, S., Lee, S., Taylor, C.G., St Martin, S.K., McHale, L., and Dorrance, A.E. (2012). Dissection of two soybean QTL conferring partial resistance to *Phytophthora sojae* through sequence and gene expression analysis. *BMC Genomics* 13: 428.
 80. Wang, J., Zhou, L., Shi, H., Chern, M., Yu, H., Yi, H., He, M., Yin, J., Zhu, X., Li, Y., Li, W., Liu, J., Wang, J., Chen, X., Qing, H., Wang, Y., Liu, G., Wang, W., Li, P., Wu, X., Zhu, L., Zhou, J.M., Ronald, P.C., Li, S., Li, J., and Chen, X. (2018). A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice. *Science* 361: 1026 - 1028.
 81. Wang, Z., Zhou, L., Lan, Y., Li, X., Wang, J., Dong, J., Guo, W., Jing, D., Liu, Q., Zhang, S., Liu, Z., Shi, W., Yang, W., Yang, T., Sun, F., Du, L., Fu, H., Ma, Y., Shao, Y., Chen, L., Li, J., Li, S., Fan, Y., Wang, Y., Leung, H., Liu, B., Zhou, Y., Zhao, J., and Zhou, T. (2022a). An aspartic protease 47 causes quantitative recessive resistance to rice black - streaked dwarf virus disease and southern rice black - streaked dwarf virus disease. *New Phytol.* 233: 2520 - 2533.
 82. Wang, N., Tang, C., Fan, X., He, M., Gan, P., Zhang, S., Hu, Z., Wang, X., Yan, T., Shu, W., Yu, L., Zhao, J., He, J., Li, L., Wang, J., Huang, X., Huang, L., Zhou, J. M., Kang, Z., and Wang, X. (2022b). Inactivation of a wheat protein kinase gene confers broad - spectrum resistance to rust fungi. *Cell* 185: 2961 - 2974.
 83. Wang, Q., Liu, Y., He, J., Zheng, X., Hu, J., Liu, Y., Dai, H., Zhang, Y., Wang, B., Wu, W., Gao, H., Zhang, Y., Tao, X., Deng,

- H., Yuan, D., Jiang, L., Zhang, X., Guo, X., Cheng, X., Wu, C., Wang, H., Yuan, L., and Wan, J. (2014).) *STV11* encodes a sulphotransferase and confers durable resistance to rice stripe virus. *Nat. Commun.* 5: 4768.
84. Wang, S., Li, Q.P., Wang, J., Yan, Y., Zhang, G.L., Yan, Y., Zhang, H., Wu, J., Chen, F., Wang, X., Kang, Z., Dubcovsky, J., and Gou, J.Y. (2019). YR36/WKS1 - mediated phosphorylation of PsbO, an extrinsic member of photosystem II, inhibits photosynthesis and confers stripe rust resistance in wheat. *Mol. Plant* 12: 1639 - 1650.
85. Wei, F.S., Wong, R.A., and Wise, R.P. (2002). Genome dynamics and evolution of the *Mla* (powdery mildew) resistance locus in barley. *Plant Cell* 14: 1903 - 1917.
86. Wen, N., Chu, Z., and Wang, S. (2003). Three types of defense - responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. *Mol. Genet. Genomics* 269: 331 - 339.
87. Wiesner-Hanks, T., and Nelson, R. (2016). Multiple disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54: 229 - 252.
88. Xu, M., Gao, C., Ji, L., Zhu, L., Gao, Y., Feng, H., Huang, L. (2023). A fungal microRNA - like RNA regulated effector promotes pathogen infection by targeting a host defense-related transcription factor. *Plant J.* <https://doi.org/10.1111/tpj.16262>
89. Yang, P., Scheuermann, D., Kessel, B., Koller, T., Greenwood, J.R., Hurni, S., Herren, G., Zhou, S., Marande, W., Wicker, T., Krattinger, S.G., Ouzunova, M., and Keller, B. (2021a). Alleles of a wall-associated kinase gene account for three of the major northern corn leaf blight resistance loci in maize. *Plant J.* 106: 526 - 535.
90. Yang, X., Zhong, S., Zhang, Q., Ren, Y., Sun, C., and Chen, F. (2021b). A loss-of-function of the dirigent gene TaDIR-B1 improves resistance to Fusarium crown rot in wheat. *Plant Biotechnol. J.* 19: 866 - 868.
91. Ye, J., Zhong, T., Zhang, D., Ma, C., Wang, L., Yao, L., Zhang, Q., Zhu, M., and Xu, M. (2019). The auxin-regulated protein ZmAuxRP1 coordinates the balance between root growth and stalk rot disease resistance in maize. *Mol. Plant* 12: 360 - 373.
92. Yin, C., Park, J.J., Gang, D.R., and Hulbert, S.H. (2014). Characterization of a tryptophan 2-monoxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27: 227 - 235.
93. Yuan, B., Shen, X., Li, X., Xu, C., and Wang, S. (2007). Mitogen - activated protein kinase OsMPK6 negatively regulates rice disease resistance to bacterial pathogens. *Planta* 226: 953 - 960.
94. Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J.M., He, S.Y., and Xin, X.F. (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR - mediated plant immunity. *Nature* 592: 105 - 109.
95. Zhang, Y.X., Wang, Q., Jiang, L., Liu, L.L., Wang, B.X., Shen, Y.Y., Cheng, X.N., and Wan, J.M. (2011). Fine mapping of *qSTV11*(KAS), a major QTL for rice stripe disease resistance. *Theor. Appl. Genet.* 122: 1591 - 1604.
96. Zhi, P., and Chang, C. (2021). Exploiting epigenetic variations for crop disease resistance improvement. *Front. Plant Sci.* 12: 692328.
97. Zhou, J.M., and Zhang, Y. (2020). Plant immunity: Danger perception and signaling. *Cell* 181: 978 - 989.
98. Zipfel, C. (2014). Plant pattern - recognition receptors. *Trends Immunol.* 35: 345 - 351.
99. Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T. and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125: 749 - 760.

ABSTRACT**Review on crop disease resistance in the OMICS era**

The molecular mechanisms involved in quantitative disease resistance (QDR) were not well known. However their advances have been noted recently. The quantitative resistance is exhibited via recognition receptors, especially the NLR receptors, which detect pathogen effectors inside the host cell. Immune signaling components include a series of transcription factors (TFs), protein kinases, etc., which are observed in the signal transduction and defense responses of plants. The phytohormones' role has attracted so much attention. They are small molecule compounds that regulates signal transduction processes, produce metabolic mechanisms (metabolites), through interaction with suitable receptor proteins. Phytohormones including JA, SA, ethylene (ET), abscisic acid (ABA), auxins, gibberellins (GAs), cytokinins (CKs), and brassinosteroids (BRs), are actively involved in plant defense systems. Epigenetics plays an important role in local defenses at the site of infection and can induce resistance in distant tissues. Genome editing at the promoters target region of the candidate genes, to become resistant is also discussed in the review.

Keywords: *cAMP (protein kinase A), MAMP: microbe-associated molecular pattern, MAPK (mitogen activated protein kinase), NLR (protein thể nhận có domain NB), PAMP: pathogen-associated molecular pattern, PRR: pattern recognition receptors, PTI: PAMP-triggered immunity.*

CÂY CỌC RÀO (*Jatropha curcas*) LÀ KÝ CHỦ TỰ NHIÊN CỦA VIRUS KHẢM LÁ SẮN SRI LANKA (*Sri Lankan cassava mosaic virus*) TẠI VIỆT NAM

Trần Văn Chiến^{1,2}, Nguyễn Thị Khánh Huyền¹,
Lê Thị Lan Hương², Trịnh Xuân Hoạt³, Hà Viết Cường^{1*}

¹ Bộ môn Bệnh cây, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Trung tâm Kiểm dịch Thực vật sau nhập khẩu I, Cục Bảo vệ thực vật

³ Viện Bảo vệ thực vật

* E-mail liên hệ: hvcuongnh@vnua.edu.vn,
cuongvietha@gmail.com; ĐT: 0978 056 254

TÓM TẮT

Năm 2022, các cây Cọc rào (*Jatropha curcas*) biểu hiện triệu chứng nhiễm virus bao gồm khảm lá, nhăn lá và lùn cây đã được quan sát thấy tại một số tỉnh miền Nam và Tây Nguyên. Xác định virus gây bệnh được thực hiện bằng Triple Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (TAS - ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) và giải trình tự. Tính gây bệnh của virus được đánh giá bằng lây nhiễm nhân tạo trên cây Cọc rào non trồng từ hạt dùng bọ phấn (*Bemisia tabaci*) và agroinoculation. Cây lây nhiễm được đánh giá triệu chứng biểu hiện, xác nhận virus nhiễm bệnh bằng PCR, Realt - time PCR và TAS - ELISA. Kết quả kiểm tra TAS - ELISA, PCR và giải trình tự đã xác định virus nhiễm trên 4 mẫu Cọc rào bệnh thu tại Tây Ninh, Phú Yên và Gia Lai là virus khảm lá sắn Sri Lanka (SLCMV) (loài *Sri Lankan cassava mosaic virus*). Kết quả thí nghiệm lây nhiễm SLCMV bằng bọ phấn và agroinoculation cho thấy cây Cọc rào lây nhiễm đã biểu hiện triệu chứng giống như bị nhiễm ngoài tự nhiên. Kiểm tra cây lây nhiễm bằng agroinoculation dùng các cặp mồi đặc hiệu DNA-A và DNA-B của SLCMV đã bước đầu chứng tỏ DNA-A của virus có khả năng nhiễm bệnh trên cây Cọc rào và tạo triệu chứng điển hình. Nghiên cứu này đã lần đầu tiên xác nhận cây Cọc rào là ký chủ tự nhiên của SLCMV tại Việt Nam.

Từ khóa: *Jatropha curcas*, *Sri Lankan cassava mosaic virus*, natural host, inoculation, Vietnam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh khảm lá sắn hiện đang là bệnh virus nguy hiểm nhất trên cây sắn tại Việt Nam. Tác nhân gây bệnh là virus khảm lá

sắn Sri Lanka (tên virus tiếng Anh: Sri Lankan cassava mosaic virus, viết tắt SLCMV). SLCMV thuộc loài *Sri Lankan cassava mosaic virus*, chi *Begomovirus*, họ *Geminiviridae*. SLCMV được xác định đầu tiên tại Sri Lanka (Saunders & cs.,

Người phân biên: TS. Nguyễn Đức Huy

2002) và cho tới trước năm 2015, cùng với một begomovirus gần gũi khác là Indian cassava mosaic virus (ICMV), chỉ giới hạn tại Tiểu lục địa Ấn Độ (Legg & cs., 2015). Năm 2015, SLCMV đã được phát hiện thấy tại Campuchia (Wang Hl & cs., 2016). Virus nhanh chóng lan sang Việt Nam (Uke & cs., 2018), phía nam Trung Quốc (Wang D & cs., 2019), Thái Lan (Siriwan & cs., 2020) và Lào (Chittarath & cs., 2021).

SLCMV là begomovirus có bộ gen kép gồm 2 phân tử DNA sợi vòng đơn ký hiệu là DNA-A và DNA-B (Saunders & cs., 2002). Giống như các begomovirus gây bệnh khảm lá sần khác, SLCMV không truyền qua hạt giống và tiếp xúc cơ học, nhưng truyền qua hom giống và bộ phận trắng (*Bemisia tabaci*) theo kiểu bền vững tuần hoàn (Legg & cs., 2015; Uke & cs., 2022).

Xác định phổ ký chủ là yêu cầu quan trọng trong nghiên cứu sinh học, dịch tễ và tiến hóa của virus. Cho đến nay, nghiên cứu về phổ ký chủ của SLCMV tương đối ít. Ngoài tự nhiên, SLCMV đã được phát hiện thấy trên cây ớt (*Capsicum annuum*) biểu hiện triệu chứng khảm lá trông cạnh các ruộng sần bị bệnh khảm lá tại Ấn Độ (Khan & cs., 2011). Gần đây hơn, SLCMV cũng được phát hiện thấy trên ba cây họ Đại kích (Euphorbiaceae) là cây Chaya (*Cnidocolus aconitifolius*), cây Cọc rào (*Jatropha curcas*) và cây Bạch phụ tử (*J. multifida*) biểu hiện triệu chứng khảm, biến vàng và biến dạng lá trông cạnh các ruộng sần bệnh tại Thái Lan (Hemnam & cs., 2022). Đáng chú ý, cây Cọc rào và các cây thuộc chi *Jatropha*

khác cũng được xác định là ký chủ tự nhiên của nhiều begomovirus và đều biểu hiện triệu chứng rất giống nhau (Snehi & cs., 2016; More & cs., 2019).

Trong năm 2022, trong quá trình điều tra, thu thập các mẫu cây biểu hiện triệu chứng bệnh virus trong hoặc gần ruộng sần bị bệnh khảm lá tại Việt Nam nhằm xác định phổ ký chủ tự nhiên của SLCMV, chúng tôi đã quan sát thấy nhiều cây Cọc rào biểu hiện triệu chứng khảm lá, biến dạng lá và lùn cây tại một số tỉnh miền Nam và Tây Nguyên. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh và qua đó đóng góp thông tin khoa học về đặc điểm sinh học, dịch tễ và tiến hóa của SLCMV tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Mẫu bệnh

Lá cây Cọc rào biểu hiện triệu chứng bệnh virus được thu thập tại các tỉnh Tây Ninh, Phú Yên và Gia Lai năm 2022. Lá cây bệnh được làm khô bằng silicagel tự chỉ thị và bảo quản ở nhiệt độ phòng tới khi sử dụng.

2.2. Lấy nhiễm nhân tạo SLCMV trên cây Cọc rào bằng bộ phận

Thí nghiệm lây nhiễm được thực hiện tại Bộ môn Bệnh cây (Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh). Cây Cọc rào sử dụng trong thí nghiệm được trồng từ hạt và được giữ trong lồng lưới chống côn trùng. Cây non 3 - 5 lá thật được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm.

Bộ phận trắng trưởng thành sạch virus sau khi vũ hóa 24 giờ được thu thập (không phân biệt giới tính) bằng ống hút côn trùng chuyên dụng và được thả lên các cây sắn bị bệnh khảm lá trong lồng lưới chống côn trùng. Bộ phận được để chích nạp virus trong 48 giờ, sau đó được chuyển sang cây Cọc rào khoẻ (30 cá thể/cây) trong lồng lưới chống côn trùng để bộ phận truyền virus. Cây Cọc rào sau khi lây nhiễm 24 giờ được phun thuốc Actara 25WG để giết bộ phận. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 cây. Cây lây nhiễm được giữ trong lồng lưới chống côn trùng để quan sát biểu hiện của triệu chứng bệnh. Sau lây nhiễm 2 tháng, tất cả các cây thí nghiệm được kiểm tra PCR bằng cặp mồi F2/R3.

2.3. Lây nhiễm nhân tạo SLCMV trên cây Cọc rào bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chứa cấu trúc xâm nhiễm của virus (agroinoculation)

Thí nghiệm lây nhiễm được thực hiện tại Bộ môn Bệnh cây (Học viện Nông nghiệp Việt Nam). Cây lây nhiễm là cây Cọc rào non được trồng từ hạt và được lây nhiễm ở 2 giai đoạn 1 và 6 tháng sau nảy mầm.

Hai cấu trúc xâm nhiễm của SLCMV gồm pCam-HLS-A-23-1.5 (chứa DNA-A) và pCam-HLS-B-2-1.5 (chứa DNA-B) đã được xây dựng từ trước tại Trung tâm Nghiên cứu Bệnh cây Nhiệt đới (Học viện Nông nghiệp Việt Nam). Mỗi cấu trúc gồm toàn bộ phân tử DNA-A hoặc DNA-B của SLCMV được lắp ráp trên vector chuyển gen thực vật pCAMBIA2300. Mỗi cấu trúc được biến nạp vào tế bào *Agrobacterium tumefaciens* chủng LBA4404

bằng phương pháp xung điện. Hai dòng vi khuẩn mang cấu trúc xâm nhiễm DNA-A và DNA-B của SLCMV được nuôi cấy riêng rẽ trên môi trường LB agar (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L và NaCl 5 g/L) chứa Streptomycin (100 mg/L), Rifampicin (25 mg/L) và Kanamycin (50 mg/L) ở 28⁰C qua đêm. Hai dòng vi khuẩn được trộn với nhau theo tỉ lệ tương đương và được hòa trong đệm lây nhiễm (MES 10 mM và MgCl₂ 10 mM, pH 5,6). Mật độ vi khuẩn trong dịch lây nhiễm được điều chỉnh bằng đo OD₆₀₀ ~1.

Cây Cọc rào non được lây nhiễm với dịch vi khuẩn tại 3 vị trí là lá (tiêm thâm thâu 2 vết đối xứng qua gân chính), thân (tiêm) và chồi đỉnh (tiêm). Mỗi cây được lây nhiễm 2 lần, cách nhau 1 tuần.

2.4. Triple-antibody sandwich ELISA (TAS - ELISA)

Phản ứng TAS - ELISA phát hiện SLCMV được thực hiện với các kháng thể do Công ty BIOTECH (Thái Lan) cung cấp. Các giếng của bản ELISA được phủ trước với 100 µl/giếng dịch kháng thể đa dòng thỏ (PAb PK, BIOTECH) đặc hiệu begomovirus được chuẩn bị trong đệm carbonate (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH9,6) theo tỉ lệ 1/500 (v/v) và bản ELISA được ủ qua đêm ở 10⁰C. Bản ELISA được rửa 3 lần với đệm PBS-T (Na₂HPO₄ 8 mM, NaCl 150 mM, KH₂PO₄ 2 mM, KCl 3 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4). Mô lá được nghiền với đệm mẫu (đệm PBS-T chứa PVP 2%) theo tỉ lệ 1:10 (w/v). Dịch cây được ly tâm để lắng tàn dư (3000 g/5 phút) và dịch trên tua được nhỏ vào giếng với lượng 100 µl/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37⁰C và được

rửa 3 lần với đệm PBS-T. Kháng thể đơn dòng chuột đặc hiệu SLCMV (MAb 29B3, BIOTECH) được hòa trong đệm kháng thể (đệm PBS-T chứa PVP 2%, ovalbumin 0,2%) với tỉ lệ 1/1000 (v/v) và được nhỏ vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37⁰C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T. Kháng thể dê liên kết Alkaline Phosphatase đặc hiệu kháng thể chuột (A3562, Sigma) được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/1000 và được cho vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37⁰C và được rửa 5 lần với đệm PBS-T. Dịch cơ chất p-nitrophenyl phosphate (SIGMAFAST, Sigma) được cố định vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 1 giờ ở 25⁰C trong tối. Phản ứng

được đo bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 405 nm.

2.5. PCR

DNA từ cây thu thập ngoài đồng ruộng được chiết bằng kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA từ cây lây nhiễm được chiết bằng phương pháp NaOH (Wang Hong & *cs.*, 1993). Mô lá (20 mg) được nghiền trong 200 μ l NaOH 0,5M. Dịch nghiền được hòa loãng 24 lần với đệm Tris 0,1 M, pH8. Dịch DNA được sử dụng ngay cho phản ứng PCR hoặc được bảo quản ở -20⁰C cho tới khi dùng.

Phản ứng PCR được thực hiện với kit 2xMyTaqTM HS Mix (Bioline). Các môi và điều kiện phản ứng PCR được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Các môi PCR sử dụng trong nghiên cứu

Môi	Trình tự (5' - 3')	Mục đích	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Kích thước (bp)	Nguồn gốc
SLCMV-B-F1	GCTTTGCAGTTGACAGCTTG	Phát hiện DNA-B của SLCMV	60	410	Nghiên cứu này
SLCMV-B-R1	ATGCAGCGTATCTTCGTTCC				
SLCMV-A-F1	TCAAGAAACGCCAGGTCTGA	Phát hiện DNA-A của SLCMV	56	423	
SLCMV-A-R1	ATAGCGCATTGAAGGCTTGG				
F2	TGTGAAGGCCCATGTAAGGT	Phát hiện DNA-A của SLCMV và ICMV	53	528	(Uke & <i>cs.</i> , 2019)
R3	CGTAGCGTATACAGGRTTAGA				
BegoA-Rev1	ATHCCMDCHATCKTBCTITGCAATCC	Phát hiện DNA-A của các begomovirus	56	~1200	(Ha & <i>cs.</i> , 2006)
BegoA-For1	TGYGARGGICCI TGYAARGTYCARTC				

2.6. Giải trình tự và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR được tinh chiết từ gel agarose dùng kit tinh chiết ExpinTM Gel SV Kit (GeneAll) theo hướng dẫn của nhà

sản xuất. Sản phẩm PCR tinh chiết được giải trình tự trực tiếp bằng môi PCR tại Macrogen (Hàn Quốc).

Trình tự mẫu được so sánh với các chuỗi đã công bố từ trước nhờ phần mềm

tìm kiếm BLAST tại NCBI (the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)).

Các trình tự phân tích được căn trình tự đa chuỗi bằng phần mềm MAFFT (Kato & Standley, 2013) sẵn có tại <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>.

Phân tích hệ thống theo phương pháp Neighbor Joining được thực hiện bằng phần mềm MEGA11 (Tamura & cs., 2021).

2.7. Real time PCR

Phản ứng Real-time PCR phát hiện SLCMV trên cây lây nhiễm được thực hiện với cặp mồi SqPCR-1f (ACTTGACGTCTGAGCTGG)/SqPCR-1r (GAACCTCACCTCCATGCT) và dò qPCR-F (FAM-TGTTGGGGTGGAACTGGTGCT-BHQ1) (Trương Thị Huỳnh Như & cs., 2022). Phản ứng Real-time PCR được thực hiện trong 20 µl dùng kit RealMOD Probe M² 2X qPCR Mix with UDG (iNtRON Bio) chứa 400 nM mỗi mồi, 200 nM dò và 0,5 µL DNA được chiết bằng

NaOH. Điều kiện phản ứng Real-time PCR như sau: hoạt hóa UDG (25°C/5 phút), khởi đầu biến tính (95°C/5 phút), 40 chu trình phản ứng (95°C/15 giây, 60°C/30 giây).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kiểm tra mẫu Cọc rào biểu hiện triệu chứng nhiễm virus bằng PCR

Bốn mẫu Cọc rào biểu hiện triệu chứng nhiễm virus gồm khảm, biến dạng lá và lùn cây (hình 4a) đã được thu thập tại Tây Ninh, Phú Yên và Gia Lai. Kiểm tra PCR các mẫu Cọc rào với cặp mồi BegoA-For1/-Rev1 (PCR-1) cho thấy chúng bị nhiễm begomovirus. Kiểm tra với cặp mồi F2/R3 (PCR-2) cho thấy chúng có thể nhiễm SLCMV hoặc ICMV. Kiểm tra với các cặp mồi SLCMV-A-F1/-R1 (PCR-3) và SLCMV-B-F1/-R1 (PCR-4) cũng như kiểm tra TAS - ELISA với kháng thể đặc hiệu SLCMV cho thấy chúng nhiễm SLCMV (bảng 2).

Bảng 2. Phát hiện begomovirus và SLCMV bằng PCR và TAS - ELISA trên các mẫu Cọc rào biểu hiện triệu chứng bệnh virus được thu thập năm 2022

Mẫu	Địa điểm thu thập (huyện, tỉnh, tọa độ)	PCR ¹				TAS - ELISA ²
		PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	
CR-TN	Tân Biên, Tây Ninh (11.486491, 106.018348)	+	+	+	+	+
CR-PY1	Sông Hinh, Phú Yên (12.998121, 108.868274)	+	+	+	+	+
CR-PY2	Sông Hinh, Phú Yên (13.005779, 108.921827)	+	+	+	+	+
CR-GL	Krong Pa, Gia Lai (13.346053, 108.514554)	+	+	+	+	KKT

Ghi chú: ¹ Các cặp mồi cho các phản ứng PCR: PCR-1 (BegoAFor1/-Rev1), PCR-2 (F2/R3), PCR-3 (SLCMV-A-F1/-R1), PCR-4 (SLCMV-B-F1/-R1). ² KKT: không kiểm tra. (+): phản ứng dương tính.

3.2. Phân tích trình tự sản phẩm PCR được nhân bằng cặp mồi SLCMV-A-F1/-R1 và SLCMV-B-F1/-R1

Để khẳng định kết quả PCR và ELISA và xác định chính xác mẫu Cọc rào thu ngoài tự nhiên bị nhiễm SLCMV, sản phẩm PCR của một mẫu Cọc rào (mẫu CR-GL) được nhân bằng 2 cặp mồi SLCMV-A-F1/-R1 và SLCMV-B-F1/-R1 đã được giải trình tự trực tiếp.

Hai trình tự thu được đã được sử dụng để tìm kiếm các trình tự gần gũi trên GenBank bằng phần mềm tìm kiếm trực tuyến (Blast search). Kết quả tìm kiếm BLAST cho thấy trình tự sản phẩm PCR (SLCMV-A-F1/-R1) có mức đồng nhất trình tự cao nhất với DNA-A của SLCMV (95 - 99%). Trình tự sản phẩm PCR (SLCMV-B-F1/-R1) có mức đồng nhất trình tự cao nhất với DNA-B của SLCMV (97 - 100%) và ICMV (97 - 98%).

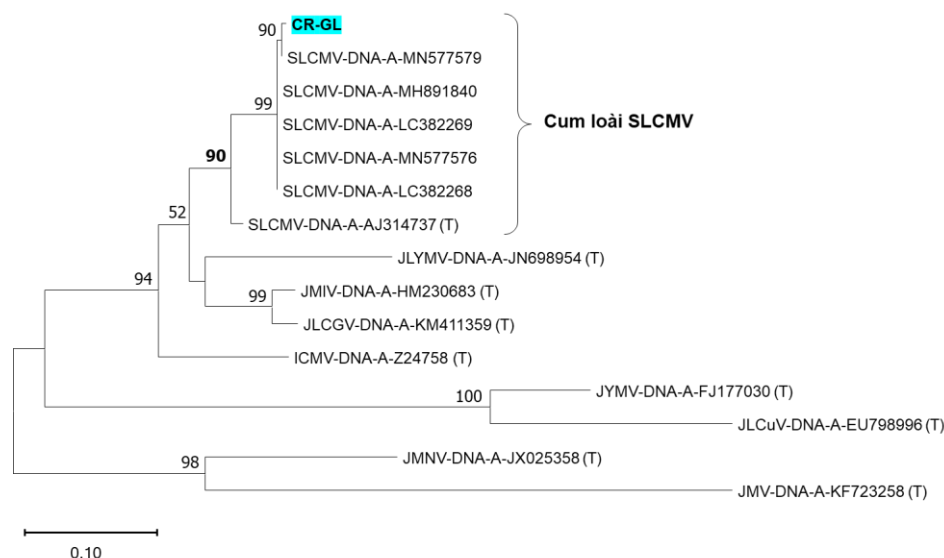
Để chứng minh rõ hơn danh tính của virus được phát hiện trên cây Cọc rào, đoạn trình tự PCR được so sánh với 3 nhóm mẫu gồm: (i) 6 mẫu SLCMV kể cả mẫu chuẩn loài, (ii) mẫu chuẩn loài của ICMV, một loài gần gũi với SLCMV và (iii) mẫu chuẩn loài của 6 begomovirus đã được xác định đầu tiên trên cây *Jatropha* (các virus với tên đầu tiên là *Jatropha*, bảng 3). Kết quả so sánh dựa trên DNA-A cho thấy mẫu CR-GL có mức đồng nhất trình tự cao nhất với các mẫu SLCMV (95,2 - 99,6%) và có mức đồng nhất trình tự thấp hơn nhiều (59,6 - 87,6%) với tất cả các mẫu virus còn lại (bảng 3). Trên cây phả hệ DNA-A, mẫu CR-GL cũng

phân nhóm rõ rệt trong cụm loài SLCMV và tách biệt rõ ràng với các nhánh virus còn lại (hình 1).

Kết quả so sánh dựa trên DNA-B cho thấy mẫu CR-GL có mức đồng nhất trình tự cao nhất với các mẫu SLCMV (96,6 - 100%) và cũng rất cao với mẫu ICMV (96,5%). Kết quả này phù hợp vì toàn bộ trình tự DNA-B của SLCMV và ICMV đã được xác định có mức đồng nhất rất cao tới 94% (Saunders & *cs.*, 2002). Ngoại trừ JMV, DNA-B của các begomovirus còn lại không sẵn có trên GenBank vì chúng là các virus có bộ gen đơn hoặc DNA-B của chúng chưa được xác định.

Định danh các begomovirus tới mức loài đã được hướng dẫn chỉ dựa trên DNA-A (Brown & *cs.*, 2015). Kết quả Blast search, so sánh trình tự và phân tích phả hệ dựa trên trình tự thu được khẳng định virus nhiễm trên mẫu CR-GL là SLCMV.

Đáng chú ý, trên cây phả hệ DNA-A, mẫu virus CR-GL và các mẫu SLCMV trên cây sắn tại Đông Nam Á và phía nam Trung Quốc lại phân nhóm trong 1 cụm và khá tách biệt với mẫu SLCMV đại diện từ Sri Lanka. Kết quả này gợi ý SLCMV trên sắn và Cọc rào tại Đông Nam Á và phía nam Trung Quốc chưa chắc có nguồn gốc từ Tiểu lục địa Ấn Độ mà có thể đã có mặt trên cây Cọc rào tại khu vực này sau đó nhiễm trên cây sắn. Nhiều mẫu SLCMV từ Cọc rào và sắn cần được giải trình tự toàn bộ bộ gen để đánh giá giá trị thiết này.



Hình 1. Cây Neighbour Joining dựa trên trình tự sản phẩm PCR của mẫu CR-GL được nhân bằng cặp mồi SLCMV-A-F1/R1 với trình tự tương ứng của SLCMV và các begomovirus được xác định trên cây thuộc chi *Jatropha*

(cây được xây dựng bằng phần mềm MEGA11. Số ở trên mỗi nốt là giá trị thống kê bootstrap (% , 1000 lần lặp, chỉ hiển thị các giá trị > 50%). Thanh tỉ lệ trình bày khoảng cách di truyền. Ký tự T trong ngoặc kép là "type representative" chỉ mẫu đại diện loài)

Bảng 3. So sánh trình tự sản phẩm PCR của mẫu CR-GL với SLCMV và các begomovirus được xác định trên cây thuộc chi *Jatropha*

Virus	Viết tắt	Mẫu GenBank ¹				Mức đồng nhất trình tự (%) ²		
		Mã GenBank (DNA-A)	Mã GenBank (DNA-B)	Mẫu (isolate)	Ký chủ gốc	Quốc gia	DNA-A	DNA-B
Sri Lankan cassava mosaic virus	SLCMV	MN577579	MW115416	Sis1	Sắn (<i>M. esculenta</i>)	Thái Lan	99,6	99,6
		MN577576	MW115414	Ome2	Sắn (<i>M. esculenta</i>)	Campuchia	99,3	100
		MH891840	MH891841	HN7	Sắn (<i>M. esculenta</i>)	Trung Quốc	99,3	99,6
		LC382269	LC382270	VnTN2	Sắn (<i>M. esculenta</i>)	Việt Nam	99,3	100
		LC382268	LC382271	VnTN5	Sắn (<i>M. esculenta</i>)	Việt Nam	99,3	100
		AJ314737 (T)	AJ314738 (T)	SLCMV-Col	Sắn (<i>M. esculenta</i>)	Sri Lanka	95,2	97,5
Jatropha mosaic India virus	JMIV	HM230683 (T)		SK-2	Cọc rào (<i>J. curcas</i>)	Ấn Độ	87,6	
Jatropha leaf curl Gujarat virus	JLCGV	KM411359 (T)		Gujarat	Cọc rào (<i>J. curcas</i>)	Ấn Độ	87,0	

Virus	Viết tắt	Mẫu GenBank ¹				Mức đồng nhất trình tự (%) ²		
		Mã GenBank (DNA-A)	Mã GenBank (DNA-B)	Mẫu (isolate)	Ký chủ gốc	Quốc gia	DNA-A	DNA-B
Indian cassava mosaic virus	ICMV	Z24758 (T)	Z24759 (T)		Sắn (<i>M. esculenta</i>)	Ấn Độ	84,1	96,5
Jatropha leaf yellow mosaic virus	JLYMV	JN698954 (T)		Katerniaghat 2	Cọc rào (<i>J. curcas</i>)	Ấn Độ	82,5	
Jatropha mosaic Nigeria virus	JMNV	JX025358 (T)		No.2	Cọc rào (<i>J. curcas</i>)	Nigeria	70,5	
Jatropha yellow mosaic virus	JYMV	FJ177030 (T)			Dầu lai tía (<i>J. gossypifolia</i>)	Ấn Độ	66,4	
Jatropha leaf curl virus	JLCuV	EU798996 (T)		New Delhi	Cọc rào (<i>J. curcas</i>)	Ấn Độ	62,6	
Jatropha mosaic virus	JMV	KF723258 (T)	KF723261 (T)	Jamaica: Spanish Town:2004	Dầu lai tía (<i>J. gossypifolia</i>)	Jamaica	59,6	57,8

Ghi chú: ¹(T): Type representative: mẫu đại diện loài; ²: mức đồng nhất trình tự được xác định từ các mẫu được căn trình tự đa chuỗi bằng phần mềm MAFFT và dựa trên đoạn DNA tương ứng sản phẩm PCR của mẫu CR-GL.

3.3. Kết quả lây nhiễm nhân tạo SLCMV trên cây Cọc rào bằng bộ phận

Để tuân thủ quy tắc Koch, các cây Cọc rào non trồng trong chậu được lây nhiễm nhân tạo bằng bộ phận chích nạp SLCMV từ cây sắn bệnh. Kết quả thí nghiệm qua 3 lần lây nhiễm độc lập cho thấy có 7/15 cây lây nhiễm biểu hiện triệu chứng điển hình gồm khảm lá, biến dạng lá (nhăn, gò gề), cây thấp lùn (hình 4b). Các triệu chứng này giống với cây nhiễm bệnh ngoài tự nhiên. Tất cả các cây lây nhiễm cũng được kiểm tra PCR bằng cặp mồi F2/R3. Kết quả kiểm tra PCR cho thấy tất cả 7 cây biểu hiện triệu chứng và 2 cây không biểu hiện triệu chứng có phản ứng PCR dương tính (bảng 4).

Kết quả lây nhiễm cho thấy cây Cọc rào khá miễn cảm với SLCMV khi triệu chứng đầu tiên có thể quan sát bằng mắt xuất hiện khá nhanh sau lây nhiễm 8 - 9 ngày. Trên cây sắn, khi lây nhiễm bằng bộ phận, triệu chứng điển hình xuất hiện trên cây sắn nuôi cấy mô trong vòng 22 ngày (Duraisamy & cs., 2013), trên cây sắn non là từ 20 đến 25 ngày (Hoạt & cs.). Cây Cọc rào nói riêng và cây thuộc chi *Jatropha* nói chung có lẽ là ký chủ phù hợp của nhiều begomovirus (Snehi & cs., 2016; More & cs., 2019). Tìm kiếm trên GenBank cũng cho thấy có ít nhất 7 begomovirus nhiễm trên nhóm cây này (bảng 3).

Bảng 4. Kết quả lây nhiễm SLCMV trên cây Cọc rào bằng bọ phấn

Lây lây	Công thức	Số cây	Số cây biểu hiện triệu chứng ¹	Thời kỳ tiềm dục (ngày) ²	Số cây phản ứng PCR dương ³
I	Lây nhiễm	5	3	8 - 28	4
	Không lây	3	0	-	0
II	Lây nhiễm	5	2	12 - 21	2
	Không lây	3	0	-	0
III	Lây nhiễm	5	2	9 - 17	3
	Không lây	3	0	-	0
TỔNG	Lây nhiễm	15	7	8 - 28	9
	Không lây	9	0	-	0

Ghi chú: ¹: triệu chứng điển hình gồm: khảm lá, biến dạng lá (nhăn), cây thấp lùn.

²: thời kỳ tiềm dục tính từ khi lây nhiễm đến khi triệu chứng có thể quan sát thấy bằng mắt.

³: phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi F2/R3 (phát hiện DNA-A) tại thời điểm 2 tháng sau lây nhiễm.

3.4. Kết quả lây nhiễm nhân tạo SLCMV trên cây Cọc rào bằng agroinoculation

Lây nhiễm nhân tạo SLCMV trên cây Cọc rào cũng được thực hiện bằng phương pháp agroinoculation. Trong 2 thí nghiệm lây nhiễm trên cây non 1 tháng tuổi và 2 tháng tuổi, có 5/6 cây lây nhiễm biểu hiện triệu chứng giống cây lây nhiễm bằng bọ phấn và cây nhiễm bệnh tự nhiên (hình 4c).

Kiểm tra các cây thí nghiệm bằng TAS - ELISA cho thấy các cây biểu hiện triệu chứng đều có giá trị OD cao hơn nhiều cây không biểu hiện triệu chứng hoặc cây đối chứng không lây nhiễm (Bảng 5). Phản ứng TAS - ELISA chứng tỏ phân tử (virion) của SLCMV đã hình thành trong cây biểu hiện triệu chứng.

Kiểm tra PCR với cặp mồi đặc hiệu DNA-A và Realtime PCR với mồi và dò

đặc hiệu DNA-A đã xác nhận sự có mặt DNA-A của SLCMV trên tất cả 5 cây lây nhiễm biểu hiện triệu chứng (bảng 5, hình 2 và hình 3).

Đáng chú ý, kiểm tra PCR với cặp mồi đặc hiệu DNA-B cho thấy chỉ 4/5 cây biểu hiện triệu chứng có phản ứng dương tính. Như vậy, mẫu cây lây L2 tạo triệu chứng điển hình, hình thành virion trong cây nhưng không chứa DNA-B. Kết quả này không ngạc nhiên vì DNA-A của SLCMV đã được chứng tỏ có khả năng gây bệnh tương tự virus hoàn chỉnh trên cây thuốc lá cảnh (*Nicotiana benthamiana*). Ngoài ra, SLCMV đã được chứng minh là hình thành từ một begomovirus có bộ gen đơn và lấy DNA-B của ICMV thông qua sự kiện tái tổ hợp vùng bảo thủ chung giữa 2 thành phần bộ gen (gọi là common region) (Saunders & cs., 2002).

Bảng 5. Kết quả lây nhiễm SLCMV trên cây Cọc rào bằng agroinoculation

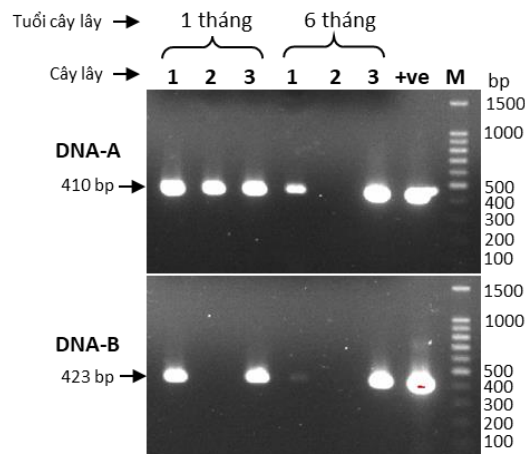
Tuổi cây lây nhiễm	Công thức	Cây thí nghiệm	Triệu chứng ¹	TAS - ELISA ²	PCR ³		Real - time PCR (Cq) ⁴
					DNA-A	DNA-B	DNA-A
1 tháng	Lây	L1	Khảm, biến dạng lá	1,333	+++	+++	25,76
		L2	Khảm, biến dạng lá	1,221	+++	-	20,86
		L3	Khảm, biến dạng lá	1,330	+++	+++	17,86
	Đối chứng (không lây)	K1	Không	0,276	-	-	-
		K2	Không	0,492	-	-	-
		K3	Không	0,328	-	-	-
6 tháng	Lây	L4	Khảm, biến dạng nhẹ	0,628	++	+	34,79
		L5	Không	0,514	-	-	-
		L6	Khảm, biến dạng lá	1,525	+++	+++	17,10
	Đối chứng (không lây)	K4	Không	0,301	-	-	-
		K5	Không	0,323	-	-	-
		K6	Không	0,329	-	-	-

Ghi chú: ¹: triệu chứng được đánh giá sau lây nhiễm 1 tháng và 2 tháng.

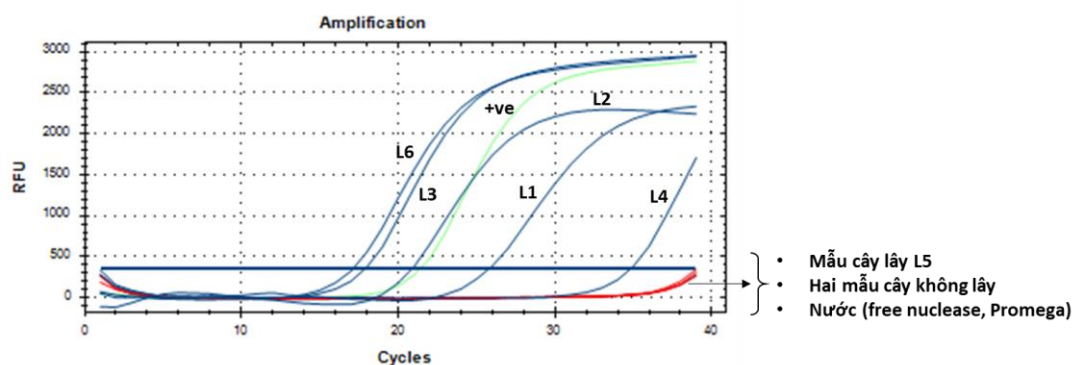
²:TAS - ELISA được thực hiện sau lây nhiễm 2 tháng.

³: PCR được thực hiện sau lây nhiễm 3 tháng, trong đó DNA-A và DNA-B được phát hiện tương ứng với cặp mồi SLCMV-A-F1/-R1 và SLCMV-B-F1/-R1. Các ký hiệu: - là không phản ứng; +, ++ và +++ là dựa trên độ đậm của băng PCR.

⁴: Real - time PCR được thực hiện trên cùng mẫu DNA với PCR.

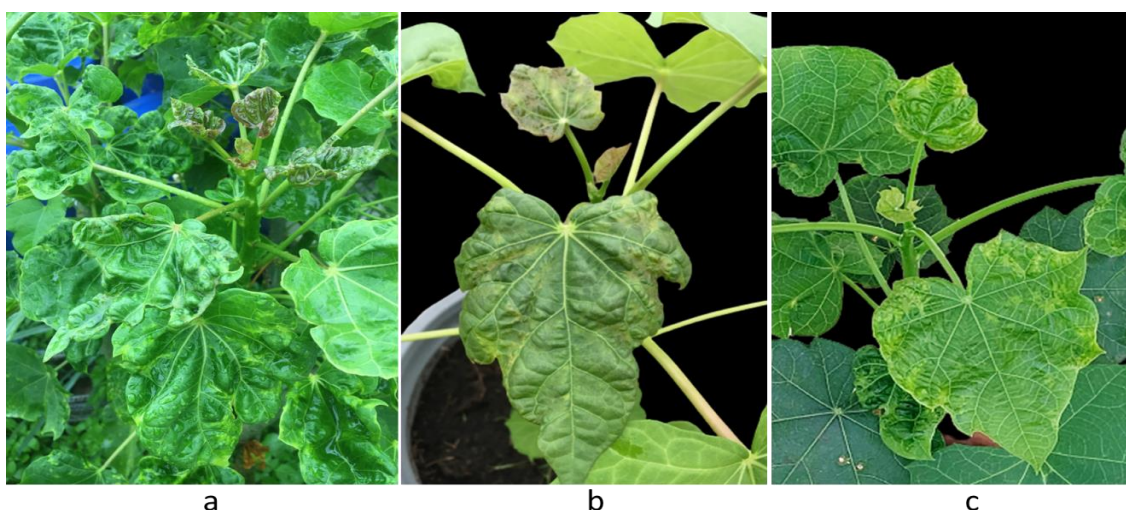
**Hình 2. PCR phát hiện SLCMV các cây Cọc rào được lây nhiễm bằng agroinoculation**

(DNA-A: được thực hiện bằng cặp mồi SLCMV-A-F1/-R1. DNA-B: được thực hiện bằng cặp mồi SLCMV-B-F1/-R1. Số ở hàng “cây lây” tương ứng cây lây trong bảng 5. Băng đặc hiệu cho mỗi phản ứng PCR được chỉ bằng mũi tên. M là thang DNA 100 bp (100 bp DNA Ladder, Promega). (+ve): đối chứng dương là khuẩn lạc vi khuẩn *Agrobacterium* mang cấu trúc xâm nhiễm được chiết bằng NaOH. Không hiển thị kết quả các mẫu cây đối chứng không lây (đều không hình thành băng sản phẩm))



Hình 3. Real-time PCR phát hiện SLCMV trên cây Cọc rào được lây nhiễm bằng agroinoculation

(phản ứng Real - time PCR được thực hiện trên cùng mẫu DNA trong phản ứng PCR. Số trên các đường phản ứng tương ứng cây lây trong bảng 5 và hình 2)



Hình 4. Triệu chứng cây Cọc rào nhiễm SLCMV ngoài tự nhiên (a), lây nhiễm bằng bọ phấn (b) và lây nhiễm bằng agroinoculation (c)

4. KẾT LUẬN

Kiểm tra ELISA, PCR và giải trình tự các mẫu Cọc rào biểu hiện triệu chứng bệnh virus được thu thập tại một số tỉnh miền Nam và Tây Nguyên năm 2022 cũng như đánh giá kết quả lây nhiễm nhân tạo bằng bọ phấn và agroinoculation đã xác nhận nguyên nhân gây bệnh virus trên cây Cọc rào là SLCMV. Nghiên cứu này lần đầu tiên xác nhận cây Cọc rào là ký chủ tự nhiên của SLCMV tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brown J. K., Zerbini F. M., Navas - Castillo J., Moriones E., Ramos-Sobrinho R., Silva J. C., Fiallo-Olivé E., Briddon R. W., Hernández - Zepeda C. & Idris A., 2015. *Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons*. Springer.
2. Chittarath K., Jimenez J., Vongphachanh P., Leiva A., Sengsay S., Lopez-Alvarez D., Bounvilayvong T., Lourido D., Vorlachith V. & Cuellar W., 2021. First report of cassava mosaic disease and Sri Lankan cassava mosaic virus in Laos. *Plant Disease*. 105(6): 1861.

3. Duraisamy R., Natesan S., Muthurajan R., Gandhi K., Lakshmanan P., Karuppusamy N. & Chokkappan M., 2013. Molecular studies on the transmission of Indian cassava mosaic virus (ICMV) and Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in cassava by Bemisia tabaci and cloning of ICMV and SLCMV replicase gene from cassava. *Molecular biotechnology*. 53: 150 - 158.
4. Ha C., Coombs S., Reville P., Harding R., Vu M. & Dale J., 2006. Corchorus yellow vein virus, a New World geminivirus from the Old World. *Journal of General Virology*. 87(4): 997 - 1003.
5. Hemniam N., Roekwan S., Vannatim N., Malichan S., Saokham K., Chaowongdee S. & Siriwan W., 2022. Natural infection of Cnidioscolus and Jatropha by Sri Lankan cassava mosaic virus in Thailand. *Journal of General Plant Pathology*. 88(6): 386 - 391.
6. Hoạt T. X., Hiếu N. C., Huy N. Q. & Huy N. Đ., 2021. Xác định phương thức lan truyền của Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) gây bệnh khảm lá sắn ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 19(2): 206 - 214.
7. Katoh K. & Standley D. M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*. 30(4): 772 - 780.
8. Khan M., Chun S., Raj S., Tiwari A., Gupta P. & Seth P., 2011. First report of Cassava mosaic virus infecting chilli (*Capsicum annum*) in India. *Journal of Plant Pathology*. 93(4, Supplement).
9. Legg J. P., Kumar P. L., Makesh Kumar T., Tripathi L., Ferguson M., Kanju E., Ntawuruhunga P. & Cuellar W., 2015. Cassava virus diseases: biology, epidemiology, and management. *Advances in virus research*. Elsevier: 85 - 142 trang.
10. More P., Agarwal P. & Agarwal P. K., 2019. Geminiviruses: Molecular biodiversity and global distribution in Jatropha. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 108: 101439.
11. Saunders K., Salim N., Mali V. R., Malathi V. G., Briddon R., Markham P. G. & Stanley J., 2002. Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology*. 293(1): 63 - 74.
12. Siriwan W., Jimenez J., Hemniam N., Saokham K., Lopez - Alvarez D., Leiva A. M., Martinez A., Mwanzia L., Lopez - Lavallo L. A. B. & Cuellar W. J., 2020. Surveillance and diagnostics of the emergent Sri Lankan cassava mosaic virus (Fam. Geminiviridae) in Southeast Asia. *Virus research*. 285: 197959.
13. Snehi S., Prihar S., Gupta G., Singh V., Raj S. & Prasad V., 2016. The current status of new emerging begomovirus diseases on Jatropha species from India. *J Plant Pathol Microbiol*. 7(357): 2.
14. Tamura K., Stecher G. & Kumar S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*. 38(7): 3022 - 3027.
15. Trương Thị Huỳnh Như, Huỳnh Thị Ngọc Mai, Trần Trung Chánh, Phạm Thị Nhạn, Lê Khanh, Phạm Quốc An & Hoàng N. H., 2022. Bước đầu nghiên cứu sự hiện diện của Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) trên sắn (*Manihot esculenta* Crantz 1766). *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh - Kỹ thuật và Công nghệ*. 17(2): 5 - 20.
16. Uke A., Hoat T. X., Quan M., Liem N., Ugaki M. & Natsuaki K. T., 2018. First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infecting cassava in Vietnam. *Plant Disease*. 102(12): 2669.
17. Uke A., Khin S., Kitaura K., Ugaki M. & Natsuaki K. T., 2019. Combination of an image - posting system and molecular diagnosis for detecting Sri Lankan cassava mosaic virus. *Tropical Plant Pathology*. 44: 238 - 243.
18. Uke A., Tokunaga H., Utsumi Y., Vu N. A., Nhan P. T., Srean P., Hy N. H., Ham L. H., Lopez - Lavallo L. A. B. & Ishitani M., 2022. Cassava mosaic disease and its management in Southeast Asia. *Plant Molecular Biology*. 1 - 11.

19. Wang D., Yao X., Huang G., Shi T., Wang G. & Ye J., 2019. First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infected cassava in China. *Plant Dis.* 103(1437): 10.1094.
20. Wang H., Cui X., Wang X., Liu S., Zhang Z. & Zhou X., 2016. First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infecting cassava in Cambodia. *Plant Disease.* 100(5).
21. Wang H., Qi M. & Cutler A. J., 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic acids research.* 21(17): 4153.

ABSTRACT

Barbados nut (*Jatropha curcas*) is natural host of Sri Lankan cassava mosaic virus in Vietnam

In 2022, Jatropha curcas plants, commonly known as Barbados nut, exhibited viral symptoms including leaf mosaic, leaf wrinkling, and stunted growth in various provinces of the South and Central Highlands of Vietnam. The causative virus was identified using the Triple Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (TAS - ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR), and sequence analysis. To assess the pathogenicity of the virus, artificial inoculation experiments were conducted on Barbados nut plants grown from seeds using the whitefly vector (Bemisia tabaci) and agroinoculation techniques. Symptom expression and presence of the viral pathogen were confirmed through PCR, Real - time PCR, and TAS - ELISA. Analysis of TAS - ELISA, PCR, and sequence data detected Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) (the species Sri Lankan cassava mosaic virus) in four symptomatic Barbados nut samples collected from provinces including Tây Ninh, Phú Yên, and Gia Lai. Artificial inoculation experiments demonstrated that the inoculated plants exhibited symptoms resembling those observed in naturally infected plants. Furthermore, PCR tests using primers specific to the DNA - A and DNA-B components of SLCMV on the agroinoculated plants suggested that SLCMV DNA-A alone could infect Barbados nut plants and induced typical symptoms. This study represents the initial confirmation of Barbados nut plants as a natural host of SLCMV in Vietnam.

Keywords: *Jatropha curcas*, Sri Lankan cassava mosaic virus, natural host, inoculation, Vietnam.

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA NHÓM GENE MÃ HÓA TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE LIÊN QUAN ĐẾN ĐÁP ỨNG BỆNH SỌC NÂU VIRUS Ở CÂY SẴN (*Manihot esculenta*)

Chu Đức Hà^{1*}, Hà Thị Quyến¹,
Phạm Châu Thùy¹, La Việt Hồng², Đồng Huy Giới³,
Nguyễn Quốc Trung³, Lê Huy Hàm¹

¹ Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

³ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

* E-mail liên hệ: cd.ha@vnu.edu.vn

TÓM TẮT

Trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) là enzyme quan trọng tham gia vào quá trình chuyển hóa trehalose ở thực vật. Đây là nhóm enzyme được ghi nhận là đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng các điều kiện bất thuận và tác nhân gây bệnh ở cây trồng. Tuy nhiên, vai trò của nhóm TPP này trong đáp ứng tác nhân gây bệnh trên cây sắn (*Manihot esculenta*) vẫn chưa được ghi nhận. Trong nghiên cứu này, cấu trúc, sự kiện lặp và mức độ biểu hiện của nhóm gene *MeTPP* đã được phân tích dựa trên cách tiếp cận tin sinh học. Cụ thể, các thành viên của nhóm gene *MeTPP* có cấu trúc chủ yếu gồm 10 exon, tương tự như ở các loài thực vật khác. Phân tích cho thấy, tổng số 2 sự kiện lặp, xảy ra trên các vùng nhiễm sắc thể khác nhau của genome cây sắn đã được xác định. Đáng chú ý, nghiên cứu đã khai thác dữ liệu biểu hiện của nhóm gene *MeTPP* ở mẫu lá xử lý lây nhiễm bệnh sọc nâu virus. Kết quả cho thấy, *MeTPP10* là gene có biểu hiện tăng cường mạnh nhất ở mẫu lá xử lý lây nhiễm nhân tạo, trong khi *MeTPP09* là gene kìm hãm biểu hiện nhất. Tóm lại, kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp 2 gene tiềm năng cho phân tích chức năng hướng đến kiểm soát tính kháng bệnh sọc nâu virus ở cây sắn.

Từ khóa: *Trehalose-6-phosphate phosphatase*, sắn, sọc nâu virus, tin sinh học.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắn (*Manihot esculenta*) được ghi nhận là một trong những cây trồng có giá trị xuất khẩu đạt ngưỡng 1 tỷ đô la Mỹ ở

Việt Nam (Malik *et al.*, 2020). Cây sắn có nhiều giá trị sử dụng, có thể cung cấp nguồn tinh bột cho con người (Nilusha *et al.*, 2021), nguyên liệu thô trong sản xuất thức ăn chăn nuôi cho gia súc (Li *et al.*, 2017; Sugiharto *et al.*, 2018) và nhiên liệu

Người phân biên: TS. Phạm Thị Lý Thu

sinh học (Ki *et al.*, 2013). Phát triển sản tại Việt Nam hiện nay đang được chú trọng đầu tư nhằm giải quyết bài toán kinh tế cho các địa phương chịu ảnh hưởng của biến đổi khí hậu. Tuy nhiên, canh tác sản hiện nay đang chịu thiệt hại lớn từ các loại bệnh do tác nhân virus, nghiêm trọng nhất có thể kể đến như khảm lá sần (gây ra bởi chi *Begomovirus*, thuộc họ Geminiviridae) (Houngue *et al.*, 2022) và sọc nâu virus (gây ra bởi chi *Ipomovirus* thuộc họ Potyviridae (Tomlinson *et al.*, 2018). Do vậy, tìm hiểu về cơ chế phản ứng của cây sắn với bệnh sọc nâu virus ở cấp độ phân tử được xem là chìa khóa để giải quyết bài toán chọn tạo giống sắn kháng bệnh trong tương lai.

Các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng, các yếu tố bất thuận (hạn hán, xâm nhập mặn và ngập úng) và tác nhân gây bệnh (bệnh hại) tác động lên cây trồng thông qua nhiều cơ chế, chủ yếu gây ra stress thẩm thấu (Huang *et al.*, 2019, Shabbir *et al.*, 2022). Do đó, việc duy trì cân bằng môi trường nội môi là rất quan trọng đối với cây trồng. Trehalose là một loại disaccharide được chứng minh là đóng vai trò đáp ứng các bất lợi từ môi trường thông qua việc điều hòa áp suất thẩm thấu nội bào (Paul *et al.*, 2018). Cơ chế sinh tổng hợp trehalose ở thực vật được thực hiện thông qua phản ứng xúc tác của trehalose-6-phosphate synthase và trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) (Iordachescu and Imai, 2008). Trong nghiên cứu trước đây, tổng số 10 thành viên của nhóm MeTPP đã được xác định trên cây sắn. Khai thác dữ liệu biểu hiện cho thấy 7 gene *MeTPP* có biểu hiện ở ít nhất một vị trí trên cây sắn trong điều kiện

thường. Các dẫn liệu này đã đặt ra câu hỏi về vai trò của nhóm MeTPP trong cơ chế đáp ứng khi lây nhiễm nhân tạo bệnh sọc nâu virus trên lá cây sắn, từ đó có thể gợi mở ra giả thuyết về con đường sinh tổng hợp trehalose liên quan đến đáp ứng tác nhân gây bệnh trên cây sắn.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm cung cấp những dẫn liệu cơ bản về cấu trúc của nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn và khai thác mức độ biểu hiện của chúng trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo với bệnh sọc nâu virus. Cụ thể, cấu trúc gene và các sự kiện gene lặp đã được phân tích trong nhóm *MeTPP* ở cây sắn bằng công cụ tin sinh học. Sau đó, dữ liệu microarray liên quan đến xử lý bệnh sọc nâu virus ở lá cây sắn đã được khai thác nhằm đánh giá biểu hiện của các gene *MeTPP*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dữ liệu genome của giống sắn AM560-2 mô tả trong nghiên cứu trước đây (Bredeson *et al.*, 2016) được khai thác trên Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012).

Dữ liệu transcriptome ở mẫu lá sắn trong điều kiện xử lý với bệnh sọc nâu virus (GEO Accession: GSE56467) (Maruthi *et al.*, 2014) được thu thập trên GEO NCBI (Barrett *et al.*, 2013).

Thông tin về nhóm MeTPP ở cây sắn được mô tả trong nghiên cứu trước đây.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân tích cấu trúc gene: trình tự gene của nhóm *MeTPP* ở cây sắn được phân tích trên GSDS (Gene

Structure Display Server) (Hu *et al.*, 2015) dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (La *et al.*, 2022; Man Le *et al.*, 2022). Cụ thể, trình tự đoạn mã hóa (coding DNA sequence) và vùng gene (genome DNA sequence) của nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn thu thập trong nghiên cứu trước đây được truy vấn trên GSDS (Gene Structure Display Server) (Hu *et al.*, 2015) để khai thác trật tự exon/intron của từng gene.

- Phương pháp dự đoán sự kiện lặp gene: trình tự đoạn mã hóa của nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn được sử dụng để dự đoán các cặp gene lặp dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2018; Niu *et al.*, 2020). Cụ thể, ClustalX (Thompson *et al.*, 2002) và BioEDIT (Hall, 1999) được sử dụng để căn trình tự và khai thác mức độ tương đồng giữa các cặp gene *MeTPP* ở cây sắn. Cặp gene lặp được định nghĩa là hai gene có mức độ tương đồng lớn hơn 90% (La *et al.*, 2022).

- Phương pháp xây dựng cây phát sinh: trình tự protein đầy đủ của nhóm *MeTPP* ở cây sắn được sử dụng để thiết lập cây phát sinh dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Chu *et al.*, 2018; Niu *et al.*, 2020). Theo đó, MEGA (Molecular Evolutionary Genetics

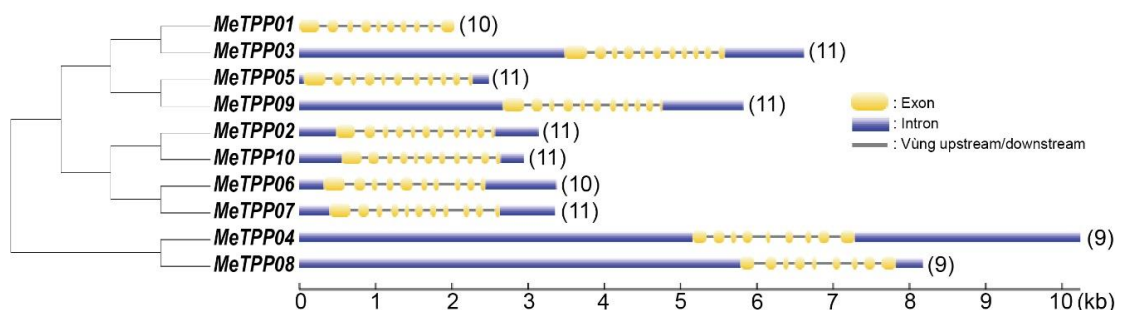
Analysis) (Tamura *et al.*, 2021) được sử dụng để xây dựng cây phát sinh của nhóm *MeTPP* ở cây sắn bằng thuật toán Neighbor-Joining với giá trị boot-strap là 1000 (Chu *et al.*, 2018; Niu *et al.*, 2020).

- Phương pháp khai thác dữ liệu biểu hiện gene: mức độ biểu hiện của nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn được phân tích trên GEO NCBI (Barrett *et al.*, 2013). Theo đó, dữ liệu RNA-Seq ở mẫu lá sắn lây nhiễm bệnh sọc nâu virus được khai thác dựa theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Maruthi *et al.*, 2014). Mức độ biểu hiện của các gene mục tiêu được thể hiện bằng giá trị fold-change. Số liệu sau đó được biểu diễn bằng ngôn ngữ R (Liao *et al.*, 2019).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích cấu trúc của nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn

Để phân tích cấu trúc của nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn, các trình tự đoạn mã hóa và vùng gene được truy vấn trên GSDS (Hu *et al.*, 2015). Kết quả sắp xếp thứ tự các gene thành viên của nhóm *MeTPP* dựa theo sơ đồ cây phát sinh được biểu diễn ở hình 1.



Hình 1. Thông tin về nhóm TF GATA ở cây sắn

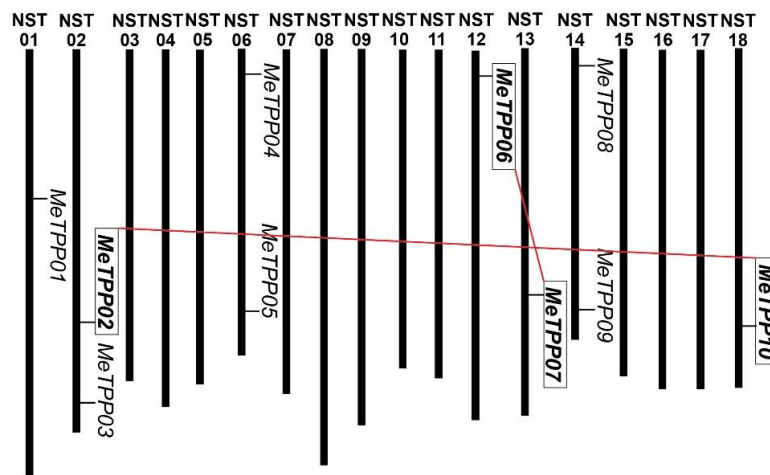
Nhìn chung, các gene thành viên trong nhóm *MeTPP* ở cây sắn có cấu trúc tương đồng nhau, với số lượng exon dao động từ 9 - 11 exon (hình 1). Cụ thể, phần lớn các gene *MeTPP* (6 trên tổng số 10) có cấu trúc gồm 11 exon (hình 1). Trong khi đó, 2 gene, *MeTPP01* và *MeTPP06* được ghi nhận với 10 exon (hình 1). Hai gene còn lại, bao gồm *MeTPP04* và *MeTPP08* có 9 exon (hình 1).

Số lượng exon ở nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn cũng đồng thuận với các nhóm gene *TPP* ghi nhận ở các loài cây trồng khác trong nghiên cứu trước đây (Rahman *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). Cụ thể, cấu trúc của nhóm gene *TPP* ở cây lúa gạo (*Oryza sativa*) chủ yếu gồm 10 và 11 exon (Rahman *et al.*, 2020). Số lượng exon ở nhóm gene *TPP* gồm 31 thành viên ở cây lúa mì (*Triticum aestivum*) dao động từ 5 đến 13 exon (Du

et al., 2022). Trong đó, 14 (trên tổng số 31) thành viên của nhóm gene *TPP* ở cây lúa mì có 9 exon, 10 gene thành viên có 10 exon (Du *et al.*, 2022). Tương tự, ở các loài bông (*Gossypium spp.*), cấu trúc gene của nhóm *TPP* tương đối đa dạng, nhưng phần lớn (53 trên tổng số 79) gene *TPP* có ít nhất 10 exon (Wang *et al.*, 2022). Những kết quả này cho thấy cấu trúc của nhóm gene *TPP* ở các loài thực vật chủ yếu gồm 10 và 11 exon.

3.2. Dự đoán hiện tượng lặp gene xảy ra ở nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn

Dự đoán sự kiện lặp xảy ra trong nhóm đa gene ở thực vật có thể gợi mở ra giả thuyết về chức năng của các gene lặp trong cơ chế phản hồi kích thích từ môi trường (Panchy *et al.*, 2016). Như vậy, trình tự đoạn mã hóa của nhóm gene *MeTPP* được sử dụng để phân tích trên các công cụ tin sinh học.



Hình 2. Phân bố của cặp gene lặp ở nhóm *MeTPP* ở cây sắn

Kết quả cho thấy, tổng số 2 sự kiện lặp, gồm 2 cặp gene lặp đã được xác định trong nhóm *MeTPP* ở cây sắn (hình 2, bảng 1). Cụ thể, mức độ tương đồng của

2 sự kiện lặp xảy ra ở nhóm *MeTPP* dao động từ 90,2 (cặp gene lặp *MeTPP02* và *MeTPP10*) - 90,3% (cặp gene lặp *MeTPP06* và *MeTPP07*) (bảng 1). Đáng

chú ý, các sự kiện lặp xảy ra ở nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn đều xuất phát từ các nhiễm sắc thể khác nhau (hình 1). Trong đó, cặp gene lặp *MeTPP02* và *MeTPP10* xuất phát từ nhiễm sắc thể 02 và 18, trong khi gene *MeTPP06* (phân bố trên nhiễm sắc thể 12) lặp với gene

MeTPP07 (phân bố trên nhiễm sắc thể 13) (hình 2). Bên cạnh đó, phân tích cho thấy tỷ lệ Ka/Ks của tất cả các sự kiện lặp đều nhỏ hơn 1 (bảng 1), chứng tỏ các đột biến trái nghĩa bị kìm hãm trong quá trình lặp, cấu trúc của các gene chị em được bảo toàn.

Bảng 1. Thông tin về cặp gene lặp ở nhóm *MeTPP* ở cây sắn

STT	Cặp gene lặp	Mức độ tương đồng	Hiện tượng lặp	Ka	Ks	Ka/Ks
1	<i>MeTPP02/MeTPP10</i>	90,2%	Lặp vùng NST	0,0355	0,2643	0,1343
2	<i>MeTPP06/MeTPP07</i>	90,3%	Lặp vùng NST	0,0513	0,2601	0,1972

Ghi chú: NST: nhiễm sắc thể; Ka: trị số thay thế trái nghĩa; Ks: trị số thay thế đồng nghĩa.

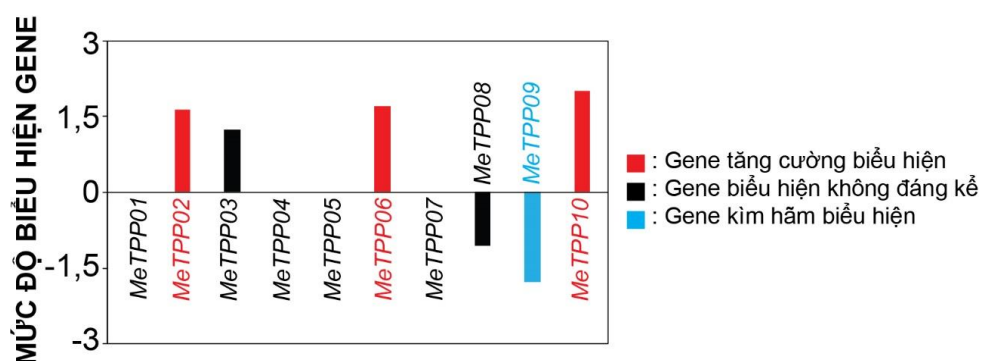
Trong nghiên cứu trước đây, 9 sự kiện lặp gene đã được báo cáo trong nhóm *TPP* ở cây lúa mỳ (Du *et al.*, 2022). Trong đó, tất cả các gene trong sự kiện lặp đều phân bố trên cùng nhiễm sắc thể trong genome của lúa mỳ (Du *et al.*, 2022). Trong khi đó, ba sự kiện lặp, xuất hiện trên các vùng nhiễm sắc thể khác nhau đã được ghi nhận ở nhóm gene mã hóa *TPP* ở cây lúa gạo (Rahman *et al.*, 2020). Những so sánh này cho thấy, hiện tượng lặp trên các nhiễm sắc thể khác nhau có thể là cơ chế chính giải thích cho sự nhân rộng của họ gene *MeTPP* ở cây sắn.

3.3. Phân tích biểu hiện của gene *MeTPP* ở mẫu lá xử lý lây nhiễm nhân tạo bệnh sọc nâu virus

Nhóm *TPP* ở thực vật được chứng minh đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng các điều kiện bất thuận, như hạn hán (Acosta - Perez *et al.*, 2020), xâm nhập mặn (Du *et al.*, 2022) và tác nhân gây bệnh (Li *et al.*, 2014). Những minh chứng này đã đặt ra câu hỏi về mức độ biểu hiện của gene *MeTPP* liên quan đến đáp ứng tác

nhân gây bệnh ở cây sắn. Trong nghiên cứu này, dữ liệu RNA-Seq ở mẫu lá lây nhiễm nhân tạo với bệnh sọc nâu virus đã được khai thác dựa theo nghiên cứu trước đây (Maruthi *et al.*, 2014). Kết quả phân tích mức độ biểu hiện được minh họa ở hình 3.

Kết quả cho thấy, các gene *MeTPP* có mức độ biểu hiện tương đối đa dạng ở mẫu lá xử lý lây nhiễm nhân tạo với bệnh sọc nâu virus (hình 3). Cụ thể, nghiên cứu đã xác định 3 (trên tổng số 10) gene, bao gồm *MeTPP02*, *MeTPP06* và *MeTPP10* được tăng cường biểu hiện (giá trị fold - change lớn hơn 1,5 - fold) ở mẫu lá xử lý bệnh (hình 3). Gene *MeTPP09* được xác định là gene bị kìm hãm biểu hiện (giá trị fold - change nhỏ hơn - 1,5 - fold) ở mẫu lá xử lý bệnh (hình 3). Trong khi đó, 2 gene, bao gồm *MeTPP03* và *MeTPP08* có biểu hiện thay đổi không đáng kể ở mẫu lá xử lý bệnh và 4 gene, bao gồm *MeTPP01*, *MeTPP04*, *MeTPP05* và *MeTPP07* có mức biểu hiện dưới ngưỡng phát hiện (hình 3).



Hình 3. Mức độ biểu hiện của nhóm gene *MeTPP* ở mẫu lá xử lý lây nhiễm bệnh sọc nâu virus

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Cấu trúc của nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn có số lượng exon đa dạng, dao động từ 9 - 11 exon. Nghiên cứu đã chỉ ra 2 sự kiện lặp ở nhóm gene *MeTPP* ở cây sắn. Các cặp gene lặp này xuất phát từ các nhiễm sắc thể khác nhau trong genome của cây sắn, với mức độ tương đồng lớn hơn 90%. Khai thác dữ liệu biểu hiện cho thấy, 3 gene, bao gồm *MeTPP02*, *MeTPP06* và *MeTPP10* tăng cường biểu hiện, trong khi gene *MeTPP09* bị giảm biểu hiện ở mẫu lá trong điều kiện xử lý lây nhiễm nhân tạo với bệnh sọc nâu virus.

Nghiên cứu này sẽ được tiếp tục nhằm phân tích chức năng của 4 gene tiềm năng nhằm tạo nguồn vật liệu cho công tác chọn tạo giống sắn kháng bệnh sọc nâu virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Acosta-Perez, P., B. D. Camacho-Zamora, E. A. Espinoza-Sanchez, G. Gutierrez-Soto, F. Zavala-Garcia, M. J. Abraham-Juarez and S. R. Sinagawa-Garcia, 2020. Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase genes and analysis of its differential expression in maize (*Zea mays*) seedlings under drought stress, *Plants*, 9, 3, 315.
2. Barrett, T., S. E. Wilhite, P. Ledoux, C. Evangelista, I. F. Kim, M. Tomashevsky, K. A. Marshall, K. H. Phillippy, P. M. Sherman, M. Holko, A. Yefanov, H. Lee, N. Zhang, C. L. Robertson, N. Serova, S. Davis and A. Soboleva, 2013. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update, *Nucleic Acids Res*, 41, Database issue, D991 - D995.
3. Bredeson, J. V., J. B. Lyons, S. E. Prochnik, G. A. Wu, C. M. Ha, E. Edsinger-Gonzales, J. Grimwood, J. Schmutz, I. Y. Rabbi, C. Egesi, P. Nauluvula, V. Lebot, J. Ndunguru, G. Mkamilo, R. S. Bart, T. L. Setter, R. M. Gleadow, P. Kulakow, M. E. Ferguson, S. Rounsley and D. S. Rokhsar, 2016. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity, *Nat Biotechnol*, 34, 5, 562 - 570.
4. Chu, H. D., K. H. Nguyen, Y. Watanabe, D. T. Le, T. L. T. Pham, K. Mochida and L. P. Tran, 2018, Identification, structural characterization and gene expression analysis of members of the Nuclear Factor - Y family in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under dehydration and abscisic acid treatments, *Int J Mol Sci*, 19, 11, 3290.
5. Du, L., S. Li, L. Ding, X. Cheng, Z. Kang and H. Mao, 2022. Genome-wide analysis of trehalose-6-phosphate phosphatases (TPP) gene family in wheat indicates their roles in plant development and stress response, *BMC Plant Biol*, 22, 1, 120.

6. Goodstein, D. M., S. Shu, R. Howson, R. Neupane, R. D. Hayes, J. Fazo, T. Mitros, W. Dirks, U. Hellsten, N. Putnam and D. S. Rokhsar, 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics, *Nucleic Acids Res*, 40, Database issue, D1178 - D1186.
7. Hall, T. A., 1999. BioEdit: A user - friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp Ser*, 41, 95 - 98.
8. Houngue, J. A., S. S. Houédjissin, C. Ahanhanzo, J. S. Pita, M. S. E. Houndénoukon and M. Zandjanakou - Tachin, 2022. Cassava mosaic disease (CMD) in Benin: Incidence, severity and its whitefly abundance from field surveys in 2020, *Crop Protection*, 158, 106007.
9. Hu, B., J. Jin, A. Y. Guo, H. Zhang, J. Luo and G. Gao, 2015. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server, *Bioinformatics*, 31, 8, 1296 - 1297.
10. Huang, H., F. Ullah, D. X. Zhou, M. Yi and Y. Zhao, 2019, Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses, *Front Plant Sci*, 10, 800.
11. Iordachescu, M. and R. Imai, 2008, Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses, *J Integr Plant Biol*, 50, 10, 1223 - 1229.
12. Ki, O. L., A. Kurniawan, C. X. Lin, Y. H. Ju and S. Ismadji, 2013. Bio - oil from cassava peel: a potential renewable energy source, *Bioresour Technol*, 145, 157 - 161.
13. La, H. V., H. D. Chu, C. D. Tran, K. H. Nguyen, Q. T. N. Le, C. M. Hoang, B. P. Cao, A. T. C. Pham, B. D. Nguyen, T. Q. Nguyen, L. Van Nguyen, C. V. Ha, H. T. Le, H. H. Le, T. D. Le and L. P. Tran, 2022. Insights into the gene and protein structures of the CaSWEET family members in chickpea (*Cicer arietinum*), and their gene expression patterns in different organs under various stress and abscisic acid treatments, *Gene*, 819, 146210.
14. Li, S., Y. Cui, Y. Zhou, Z. Luo, J. Liu and M. Zhao, 2017. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects, *J Sci Food Agric*, 97, 8, 2282 - 2290.
15. Li, Z. G., L. J. Luo and L. P. Zhu, 2014. Involvement of trehalose in hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced the acquisition of heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings, *Bot Stud*, 55, 1, 20.
16. Liao, Y., G. K. Smyth and W. Shi, 2019. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads, *Nucleic Acids Res*, 47, 8, e47.
17. Malik, A. I., P. Kongsil, V. A. Nguyễn, W. Ou, Sholihin, P. Srean, M. N. Sheela, L. A. Becerra López-Lavalle, Y. Utsumi, C. Lu, P. Kittipadakul, H. H. Nguyễn, H. Ceballos, T. H. Nguyễn, M. Selvaraj Gomez, P. Aiemnaka, R. Labarta, S. Chen, S. Amawan, S. Sok, L. Youabee, M. Seki, H. Tokunaga, W. Wang, K. Li, H. A. Nguyễn, V. Đ. Nguyễn, L. H. Hâm and M. Ishitani, 2020. Cassava breeding and agronomy in Asia: 50 years of history and future directions, *Breeding Science*, advpub, 2, 145 - 166.
18. Man Le, T., T. T. Huyen Tran, X. Quyen Vu, H. Duc Chu, T. Chau Pham, H. Thi Le, Q. Thi Ngoc Le, V. Hong La and P. Bang Cao, 2022. Genome-wide identification and analysis of genes encoding putative Heat Shock Protein 70 in papaya (*Carica papaya*), *Pak J Biol Sci*, 25, 6, 468 - 475.
19. Maruthi, M. N., S. Bouvaine, H. A. Tufan, I. U. Mohammed and R. J. Hillocks, 2014. Transcriptional response of virus-infected cassava and identification of putative sources of resistance for cassava brown streak disease, *PloS one*, 9, 5, e96642.
20. Nilusha, R. A. T., J. Jayasinghe, O. Perera, P. I. P. Perera and C. V. L. Jayasinghe, 2021. Proximate composition, physicochemical, functional, and antioxidant properties of flours from selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties, *Int J Food Sci*, 2021, 6064545.
21. Niu, L., H. D. Chu, C. D. Tran, K. H. Nguyen, H. X. Pham, D. T. Le, W. Li, W. Wang, T. D. Le and L. - S. P. Tran, 2020. The GATA gene family in chickpea: Structure analysis and transcriptional responses to abscisic acid and dehydration treatments revealed potential genes involved in drought adaptation, *J Plant Growth Regul*, 39, 4, 1647 - 1660.
22. Panchy, N., M. Lehti - Shiu and S. - H. Shiu, 2016. Evolution of gene duplication in plants, *Plant Physiol*, 171, 4, 2294 - 2316.
23. Paul, M. J., A. Gonzalez - Uriarte, C. A. Griffiths and K. Hassani - Pak, 2018. The role of trehalose 6 - phosphate in crop yield and resilience, *Plant Physiol*, 177, 1, 12 - 23.

24. Rahman, M. M., M. M. Rahman, J. - S. Eom and J. - S. Jeon, 2020. Genome - wide identification, expression profiling and promoter analysis of trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in rice, *J Plant Biol*, 64, 1, 55 - 71.
25. Shabbir, R., R. K. Singhal, U. N. Mishra, J. Chauhan, T. Javed, S. Hussain, S. Kumar, H. Anuragi, D. Lal and P. Chen, 2022. Combined abiotic stresses: Challenges and potential for crop improvement, *Agronomy*, 12, 11, 2795.
26. Sugiharto, S., T. Yudiarti, I. Isroli and E. Widiastuti, 2018. The potential of tropical agro - industrial by - products as a functional feed for poultry, *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8, 375 - 385.
27. Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar, 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Mol Biol Evol*, 38, 7, 3022 - 3027.
28. Thompson, J. D., T. J. Gibson and D. G. Higgins, 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX, *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 2, Unit 2.3.
29. Tomlinson, K. R., A. M. Bailey, T. Alicai, S. Seal and G. D. Foster, 2018. Cassava brown streak disease: historical timeline, current knowledge and future prospects, *Mol Plant Pathol*, 19, 5, 1282 - 1294.
30. Wang, W., H. Cui, X. Xiao, B. Wu, J. Sun, Y. Zhang, Q. Yang, Y. Zhao, G. Liu and T. Qin, 2022. Genome - wide identification of cotton (*Gossypium* spp.) trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) gene family members and the role of *GhTPP22* in the response to drought stress, *Plants*, 11, 8, 1079.

ABSTRACT

Analysis of expression patterns of genes encoding trehalose-6-phosphate phosphatase under the cassava brown streak disease treatment in cassava (*Manihot esculenta*)

Trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) has been reported to involve in trehalose biosynthesis in plant species. This enzyme was demonstrated to play an important role in abiotic stress and biotic stress response in crops. However, the functions of the TPP family in the responsiveness of pathogens in cassava (Manihot esculenta) have been still unclear. In this study, gene structure, gene duplication and expression pattern of the MeTPP gene family have been analyzed by the bioinformatics approaches. Particularly, most members of the MeTPP gene family contained 10 exons, as similar as the TPP gene family in other higher plant species. Our prediction suggested that 2 segmental duplicated pairs occurred in the MeTPP gene family in cassava. Of our interest, we re - analyzed the transcriptome atlas obtained from the cassava brown streak disease - inoculated leaf samples. We found that MeTPP10 and MeTPP09 were the most induced and reduced genes in treated leaves, respectively. Taken together, our results could provide a list of two potential genes for further functional characterization to improve disease resistance in cassava plants.

Keywords: *Trehalose-6-phosphate phosphatase, cassava, cassava brown streak disease, bioinformatics.*

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN *Pectobacterium carotovorum* GÂY BỆNH THỐI NHŨN HÀNH, TỎI VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA MỘT SỐ LOẠI HOẠT CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT ĐẾN VI KHUẨN TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro*

Ngô Quang Huy¹, Lê Quang Mẫn¹, Nguyễn Mạnh Hùng¹,
Lê Thị Hằng¹, Trần Thị Hoa¹, Nguyễn Văn Tuất²

¹Viện Bảo vệ thực vật

²Hội Khoa học kỹ thuật Bảo vệ thực vật Việt Nam

TÓM TẮT

Những năm gần đây, bệnh thối nhũn hành, tỏi được ghi nhận ở hầu hết các vùng trồng hành trong cả nước từ giai đoạn cây con đến trước và sau khi thu hoạch. Tác nhân được xác định là do vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* gây ra. Nghiên cứu này đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum*, cũng như hiệu lực ức chế của một số loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học và sinh học trong điều kiện *in vitro*. Vi khuẩn *P. carotovorum* phát triển tốt nhất trên môi trường PDA - PT có pH trong khoảng 7,5 đến 8 và ở nhiệt độ 30 - 35°C. Các hoạt chất hóa học Copper hydroxide, Oxolinic acid, Quaternary ammonium salts và Fosetyl aluminium duy trì khả năng ức chế cao từ 99,93% tới 100% sau 72 giờ xử lý. Trong số những hoạt chất sinh học thí nghiệm, hoạt chất Cytosinepeptidomycin có hiệu lực ức chế cao nhất 99,61% sau 24 giờ xử lý. Tuy nhiên, hiệu lực ức chế suy giảm còn 99,38% và 99,26% tương ứng sau 48 và 72 giờ xử lý.

Từ khóa: hành, tỏi, bệnh thối củ, vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hành, tỏi (họ Allium) là cây gia vị được trồng lâu đời và chiếm một vị trí quan trọng trong ngành sản xuất rau trên thế giới. Cây hành, tỏi được trồng ở 175 quốc gia và vùng lãnh thổ, 5 nước đứng đầu là Trung Quốc, Ấn Độ, Mỹ, UAE và Thổ Nhĩ Kỳ có sản lượng chiếm 56,42% toàn thế

giới. Diện tích trồng hành, tỏi trên thế giới hơn 1,8 triệu ha, năng suất trung bình đạt 19,12 tấn/ha và sản lượng đạt 32,29 triệu tấn (FAO, 2020).

Một trong những nguyên nhân gây thối nhũn cây trồng là vi khuẩn. Các triệu chứng thối nhũn là hệ quả của quá trình phân hủy pectin trong thành tế bào thực vật của enzym pectinase (Gavrilovic *et al.*, 2001). Tại Việt Nam rất nhiều loài vi

khẩn gây ra hiện tượng thối nhũn trên các cây trồng như loài *Dickeya chrysanthemi* gây thối nhũn trên cây khoai lang (Nguyễn Lê Thanh Mai và cs., 2020), loài *P. carotovorum* gây thối nhũn trên cây hành, tỏi (Nguyễn Thị Vân, 2010; Ngô Quang Huy và cs., 2021), trên cây mít (Hứa Thanh Hải và cs., 2020) và cây sâm ngọc linh (Trương Thị Chiên và cs., 2019).

Bệnh thối nhũn do vi khuẩn gây ra rất khó phòng trừ do vi khuẩn có khả năng tồn tại trong đất, trong cơ thể cây ký chủ, tàn dư thực vật, hạt giống, củ giống. Do đó, nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum* gây bệnh thối nhũn hành, tỏi và đánh giá khả năng ức chế của một số loại hoạt chất bảo vệ thực vật đến vi khuẩn trong phòng thí nghiệm là cần thiết để xây dựng biện pháp phòng trừ bệnh hiệu quả, bền vững trong điều kiện đồng ruộng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu vi khuẩn *P. carotovorum* được phân lập từ hành, tỏi có triệu chứng thối nhũn thu thập tại các vùng trồng hành ở xã Huyện Sơn, huyện Lục Nam, tỉnh Bắc Giang; xã Hiệp Hòa, huyện Kinh Môn, tỉnh Hải Dương; xã Minh Tân, huyện Vĩnh Lộc, tỉnh Thanh Hóa.

Môi trường thí nghiệm gồm: WA lỏng (nước cất 1000 ml), PDA-PT lỏng (200 g Khoai tây, 20 g Dextrose, 5 g Pepton, bổ sung nước cất cho đầy 1000 ml), SPA lỏng (20 g Dextrose, 5 g Pepton, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, bổ sung nước cất cho đầy 1000 ml) và King's b (10 ml Glycerol,

C.P, 20 g Proteose peptone số 3, 1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g $MgSO_4$, bổ sung nước cất cho đầy 1000 ml).

Các loại thuốc sinh học và hóa học. Các hóa chất, trang thiết bị, dụng cụ thí nghiệm cần thiết phục vụ cho thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm sinh học nuôi cấy của vi khuẩn *P. carotovorum*

a) Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum*

Vi khuẩn được phân lập và làm thuần trên môi trường nước cất - Agar (WA). Nhân sinh khối vi khuẩn trong môi trường PDA-PT lỏng, đặt dịch khuẩn trong máy lắc với vòng quay 160 vòng/phút, ở mức nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 24 giờ. Sau 24 giờ, lấy 1 ml dịch khuẩn có nồng độ bằng nhau cho vào 5 ml môi trường lỏng PDA-PT, King' B, SPA, WA với 3 lần nhắc lại, đặt môi trường có chứa dịch khuẩn trong máy lắc với vòng quay 160 vòng/phút, ở mức nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 16, 24 và 32 giờ. Kiểm tra mật độ vi khuẩn theo phương pháp Begot *et al.* (1996), mỗi lần đo mật độ là 1 ml dịch khuẩn được nhắc lại 3 lần.

b) Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum*

Vi khuẩn được phân lập và làm thuần trên môi trường nước cất - Agar (WA). Nhân sinh khối vi khuẩn trong môi trường PDA-PT lỏng, đặt dịch khuẩn trong máy lắc với vòng quay 160 vòng/phút, ở mức nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 24 giờ. Sau 24 giờ, lấy 1 ml dịch khuẩn cho

vào 5 ml môi trường lỏng PDA-PT với 3 lần nhắc lại, đặt môi trường có chứa dịch khuẩn trong máy lắc với vòng quay 160 vòng/phút ở các mức nhiệt độ 20, 25, 30, 35 và 40°C trong khoảng thời gian 16, 24 và 32 giờ. Kiểm tra mật độ vi khuẩn theo phương pháp Begot *et al.* (1996), mỗi lần đo mật độ là 1 ml dịch khuẩn được nhắc lại 3 lần.

c) Nghiên cứu ảnh hưởng của các mức pH đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn P. carotovorum

Vi khuẩn được phân lập và làm thuần trên môi trường nước cất - Agar (WA). Nhân sinh khối vi khuẩn trong môi trường PDA-PT lỏng, đặt dịch khuẩn trong máy lắc với vòng quay 160 vòng/phút, ở mức nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 24 giờ. Sau 24 giờ, lấy 1 ml dịch khuẩn cho vào 5 ml môi trường PDA-PT lỏng ở các ngưỡng pH khác nhau 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 và 8,5; với 3 lần nhắc lại, đặt môi trường có chứa dịch khuẩn trong máy lắc với vòng quay 160 vòng/phút, ở mức nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 16, 24 và 32 giờ. Kiểm tra mật độ vi khuẩn theo phương pháp Begot *et al.* (1996), mỗi lần đo mật độ là 1 ml dịch khuẩn được nhắc lại 3 lần.

2.2.2. Thử nghiệm một số biện pháp phòng trừ trong điều kiện in vitro

a) Đánh giá hiệu lực của một số chế phẩm sinh học đối với vi khuẩn P. carotovorum

Cho chế phẩm sinh học theo nồng độ thí nghiệm + 1 ml dịch khuẩn có nồng độ 1×10^6 CFU/ml vào 100 ml môi trường PDA-PT lỏng. Đặt trong máy lắc ở nhiệt độ 30°C, lắc 160 vòng/phút, sau 24, 48 và 72 giờ lấy 0,5 ml trang trên bề mặt môi trường PDA-PT. Mỗi công thức nhắc lại 3

đĩa môi trường. Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của khuẩn lạc. Thí nghiệm gồm các loại thuốc: Cytosinpeptidemycin 4% (Sat 4SL) 0,1%, Ningnanmycin 40g/l (Bonny 4SL) 0,18%, *Chaetomium* spp và *Trichoderma* spp. 1.10^8 CFU/ml (Elicitor 250EC) 0,125%, *Streptomyces lydicus* (Acti No vate 1SP) 0,25%, Kasugamycin 4% (Kamsu 4SL) 0,25%.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ khuẩn lạc ở các thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau xử lý.

- Hiệu lực của thuốc được tính theo công thức Abbott.

$$\text{Hiệu lực (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó: C: mật độ khuẩn lạc ở công thức đối chứng; T: mật độ khuẩn lạc ở công thức thử thuốc.

b) Đánh giá hiệu lực của một số thuốc hóa học đối với vi khuẩn P. carotovorum

Cho thuốc hóa học theo nồng độ thí nghiệm + 1 ml dịch khuẩn có nồng độ 1×10^6 CFU/ml vào 100 ml môi trường PDA-PT lỏng. Đặt trong máy lắc ở nhiệt độ 30°C, lắc 160 vòng/phút sau 24, 48 và 72 giờ lấy 0,5 ml trang trên bề mặt môi trường PDA-PT. Mỗi công thức nhắc lại 3 đĩa môi trường. Theo dõi sinh trưởng và phát triển của khuẩn lạc. Thí nghiệm gồm các loại thuốc: Copper hydroxide (Coc 85WP) 0,25%, Oxolinic acid (Starner 20WP) 0,1%, Quaternary ammonium salts 20% (Physan 20SL) 0,2%, Bismertiazol + kasugamycin (Probiocol 200WP) 0,2%, Streptomycin sulfate (Strep Gold 70WP) 0,06%, Fosetyl aluminium (Aliette 800WP) 0,3%, đối chứng (không xử lý).

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ khuẩn lạc ở các thời điểm 24, 48 và 72 giờ sau xử lý.

- Hiệu lực của thuốc được tính theo công thức Abbott.

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft office Excel và phân tích bằng phần mềm Statistix 10.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh học nuôi cấy của vi khuẩn *P. carotovorum*

3.1.1. Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum*

Môi trường, nhiệt độ và độ pH là ba yếu tố liên quan mật thiết tới sự sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn. Vi khuẩn

P. carotovorum như các loài sinh vật khác chỉ tồn tại khi có các ký chủ thích hợp hay được cung cấp nguồn thức ăn. Với mục đích là lựa chọn được loại môi trường nhân tạo thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum* gây bệnh thối nhũn trên hành, tôi phục vụ cho công việc nghiên cứu loài vi khuẩn này, thí nghiệm nuôi cấy trên 4 loại môi trường nhân tạo lỏng: PDA-PT, SPA, King' B và WA được tiến hành. Đo sự tán xạ ánh sáng ở bước sóng 600 nm đối với vi khuẩn, nhân sinh khối vi khuẩn *P. carotovorum* trên 4 loại môi trường lỏng, đặt trong máy lắc 160 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 16 giờ, 24 giờ và 32 giờ (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. Carotovorum* (Viện Bảo vệ thực vật, 2020)

Môi trường	Giá trị mật độ quang (OD) đo ở bước sóng 600 nm		
	16 giờ	24 giờ	32 giờ
PDA-PT	1,214 ± 0,084 ^a	1,410 ± 0,068 ^a	1,581 ± 0,070 ^a
SPA	1,046 ± 0,075 ^b	1,168 ± 0,60 ^b	1,272 ± 0,038 ^b
King' B	1,035 ± 0,010 ^b	1,134 ± 0,009 ^b	1,235 ± 0,011 ^b
WA	0,564 ± 0,017 ^c	0,623 ± 0,011 ^c	0,743 ± 0,012 ^c
CV (%)	6,73	3,93	3,62

Độ hấp thu tại bước sóng OD600 nhiều thì mật độ quang càng lớn đồng nghĩa với mật độ vi khuẩn càng cao. Trên môi trường PDA-PT vi khuẩn đạt cao nhất với 16 giờ nuôi cấy, vì độ hấp thu tại bước sóng OD600 là cao nhất với mật độ 1,214; sau 32 giờ nuôi cấy mật độ vi khuẩn đo được đạt 1,581. Hai loại môi trường SPA và King' B thấp hơn cùng một phân lớp sau 16 giờ nuôi cấy mật độ đạt 1,035 - 1,046; sau 32 giờ nuôi cấy mật độ đạt 1,581. Trên môi trường WA sau 32 giờ nuôi cấy có mật độ thấp nhất 0,743.

3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum*

Đối với sự phát triển nhiều loài vi sinh vật, nhiệt độ đóng vai trò rất quan trọng, quyết định sự tồn tại cũng như phát triển của chúng. Các loài vi sinh vật gây bệnh hại cây trồng nói chung và vi khuẩn gây bệnh nói riêng đều chịu tác động rất lớn từ yếu tố này. Để đánh giá ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ đến sự phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum*, tiến hành nuôi cấy loài vi khuẩn này trên

môi trường PDA-PT lỏng ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau 20, 25, 30, 35 và 40°C đo tại bước sóng OD600.

Ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau vi khuẩn đều có khả năng tồn tại và phát triển nhưng sự phát triển của chúng ở các ngưỡng nhiệt độ là khác nhau. Cụ thể, mức nhiệt độ 30°C và 35°C mật độ cao nhất sau 32 giờ nuôi cấy lần lượt đạt 1,422 và 1,334. Mức nhiệt độ 25°C mật độ đạt 1,134. Thấp nhất là mức nhiệt độ 20°C và

40°C có mật độ tương ứng là 0,814 và 0,835 (bảng 2).

Vi khuẩn *P. carotovorum* phát triển thuận lợi trong điều kiện nhiệt độ từ 30 đến 35°C. Kết quả nghiên cứu này giống với kết quả nghiên cứu của Du Raan và cs. (2016), theo nghiên cứu của tác giả vi khuẩn phát triển thuận lợi trong phạm vi nhiệt độ khá rộng từ 20 - 40°C, nhiệt độ thích hợp nhất cho sự phát triển của *P. carotovorum* là từ 31 - 34°C.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum* (Viện Bảo vệ thực vật, 2020)

Mức nhiệt độ (°C)	Giá trị mật độ quang (OD) đo ở bước sóng 600 nm		
	16 giờ	24 giờ	32 giờ
20	0,646 ± 0,046 ^b	0,724 ± 0,038 ^c	0,814 ± 0,042 ^c
25	0,801 ± 0,086 ^b	1,012 ± 0,058 ^b	1,134 ± 0,071 ^b
30	1,155 ± 0,131 ^a	1,311 ± 0,081 ^a	1,422 ± 0,071 ^a
35	1,111 ± 0,068 ^a	1,256 ± 0,064 ^a	1,334 ± 0,044 ^a
40	0,697 ± 0,041 ^b	0,779 ± 0,044 ^c	0,835 ± 0,031 ^c
CV (%)	10,25	6,46	5,12

3.1.3. Ảnh hưởng của các mức pH đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum*

Bên cạnh yếu tố môi trường và nhiệt độ, pH cũng là một yếu tố quan trọng trong sự phát triển của vi sinh vật. Thí nghiệm đánh giá khả năng sinh trưởng của các loài vi khuẩn *P. carotovorum* trên môi trường PDA-PT lỏng ở 10 ngưỡng pH khác nhau từ pH = 4,0 đến pH = 8,5 đo tại bước sóng OD600.

Vi khuẩn *P. carotovorum* phát triển thuận lợi hơn trên môi trường trung tính đến kiềm và phát triển chậm hơn trên môi trường có tính axit. Mật độ vi khuẩn sau 32 giờ nuôi cấy ở ngưỡng pH = 7,5 - 8,0

cao nhất đạt 1,334 - 1,447; Tiếp theo đến ngưỡng pH = 7,0 mật độ vi khuẩn đạt 1,221. Thấp nhất là pH = 4 có mật độ 0,502 (bảng 3).

Kết quả nghiên cứu trên giống với kết quả đã được công bố bởi Shahbaz và cộng sự năm 2007, khi nghiên cứu sự phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum* ở các ngưỡng pH từ 4 đến 8 trên môi trường dinh dưỡng - agar, theo tác giả vi khuẩn *P. carotovorum* phát triển tốt nhất ở ngưỡng pH = 7 - 8. Tuy nhiên, ở ngưỡng pH = 5, khả năng phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum* thấp hơn rất nhiều so với các ngưỡng pH cao hơn trong thí nghiệm đã tiến hành.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các mức pH đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *P. carotovorum* (Viện Bảo vệ thực vật, 2020)

Mức pH	Giá trị mật độ quang (OD) đo ở bước sóng 600 nm		
	16 giờ	24 giờ	32 giờ
4,0	0,432 ± 0,081 ^g	0,489 ± 0,064 ^f	0,502 ± 0,044 ^g
4,5	0,758 ± 0,010 ^f	0,834 ± 0,011 ^e	0,945 ± 0,037 ^f
5,0	0,860 ± 0,026 ^e	0,989 ± 0,049 ^d	1,034 ± 0,040 ^e
5,5	1,002 ± 0,068 ^d	1,136 ± 0,054 ^c	1,179 ± 0,037 ^d
6,0	1,023 ± 0,034 ^{cd}	1,156 ± 0,023 ^c	1,193 ± 0,032 ^{cd}
6,5	1,031 ± 0,032 ^{cd}	1,187 ± 0,031 ^c	1,221 ± 0,036 ^{cd}
7,0	1,160 ± 0,042 ^b	1,262 ± 0,043 ^b	1,334 ± 0,043 ^b
7,5	1,272 ± 0,043 ^a	1,353 ± 0,025 ^a	1,447 ± 0,021 ^a
8,0	1,269 ± 0,046 ^a	1,321 ± 0,043 ^{ab}	1,456 ± 0,035 ^a
8,5	1,109 ± 0,062 ^{bc}	1,188 ± 0,045 ^c	1,245 ± 0,34 ^c
CV (%)	5,12	3,66	3,21

Như vậy, môi trường PDA-PT lỏng, nhiệt độ 30 - 35°C và pH = 7,5 - 8 là điều kiện thích hợp cho loài *P. carotovorum* sinh trưởng và phát triển.

3.2. Thử nghiệm một số biện pháp phòng trừ trong điều kiện in vitro

3.2.1. Hiệu lực của một số chế phẩm sinh học đối với vi khuẩn *P. carotovorum*

Các chế phẩm sinh học được sử dụng trong thí nghiệm đều có hiệu lực ức chế vi khuẩn *P. carotovorum*. Hoạt chất sinh học

Cytosinepeptidemycin cho hiệu lực ức chế cao nhất đạt 99,61% sau 24 giờ xử lý và hiệu lực kéo dài sau 72 giờ xử lý đạt 99,26%. Tiếp đến, hoạt chất sinh học *Chaetomium* spp và *Trichoderma* spp. cho hiệu lực ức chế đạt 78,52% sau 72 giờ xử lý. Hoạt chất Kasugamycin cũng cho hiệu lực ức chế vi khuẩn *P. carotovorum* sau 72 giờ xử lý là 61,95%. Hai loại hoạt chất *Streptomyces lydicus* và Ningnanmycin có hiệu lực ức chế dưới 35% (bảng 4).

Bảng 4. Hiệu lực của một số loại chế phẩm sinh học đối với vi khuẩn *P. carotovorum* trong phòng thí nghiệm (Viện Bảo vệ thực vật, 2021)

Công thức	Hiệu lực (%) sau... xử lý		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
Cytosinepeptidemycin (Sat 4SL)	99,61 ^a	99,38 ^a	99,26 ^a
Ningnanmycin 40g/l (Bonny 4SL)	33,77 ^e	30,09 ^d	29,66 ^d
<i>Chaetomium</i> spp. và <i>Trichoderma</i> spp. (Elicitor 50EC)	87,43 ^b	81,10 ^b	78,52 ^b
<i>Streptomyces lydicus</i> (ActiNovate 1SP)	36,22 ^d	32,15 ^d	31,01 ^d
Kasugamycin (Kamsu 4SL)	70,80 ^c	65,29 ^c	61,95 ^c
Đối chứng (nước cất)	-	-	-
CV (%)	4,08	6,05	5,62
LSD _{0,05}	5,03	7,02	6,35

Ghi chú: những chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa, ở mức giá trị 95% theo Duncan.

Như vậy, hoạt chất sinh học Cytosinpeptidemycyn cho hiệu lực ức chế cao nhất đối với vi khuẩn *P. carotovorum*, đây là một sản phẩm chuyển hóa thứ cấp từ vi khuẩn *Streptomyces ahngroscopicus* đã được đăng ký sử dụng tại Trung Quốc để phòng chống bệnh virus thông qua cơ chế tạo tính kháng tập nhiễm hệ thống SAR. Mặt khác thử nghiệm ức chế cao trong phòng thí nghiệm đối với vi khuẩn *P. carotovorum* vậy nên hoàn toàn có thể đưa ra ngoài sản xuất để phòng trừ bệnh thối nhũn và virus gây ra.

3.2.2. Hiệu lực của một số thuốc hóa học đối với vi khuẩn *P. carotovorum*

Các loại hoạt chất hóa học đều có khả năng ức chế với vi khuẩn *P. carotovorum* đạt từ 88,68 - 100%, trong đó có 4 loại hoạt chất Copper hydroxide, Oxolinic acid, Quaternary ammonium salts và Fosetyl aluminium có hiệu lực ức chế cao nhất sau 72 giờ theo dõi đạt 99,93 - 100%. Hoạt chất Bismertiazol + kasugamycin sau 72 giờ theo dõi có hiệu lực ức chế vi khuẩn đạt 93,36% và thấp nhất là hoạt chất Streptomycin sulfate cho hiệu quả ức chế đạt 88,68% sau 72 giờ theo dõi (bảng 5).

Bảng 5. Hiệu lực của một số loại thuốc hóa học đối với vi khuẩn *P. carotovorum* trong phòng thí nghiệm (Viện Bảo vệ thực vật, 2021)

Công thức	Hiệu lực (%) sau... xử lý		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
Copper hydroxide (Coc 85 WP)	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a
Oxolinic acid (Starnar 20WP)	99,89 ^a	99,86 ^a	99,86 ^a
Quaternary ammonium salts (Physan 20SL)	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a
Bismertiazol + kasugamycin (Probiocol 200WP)	95,05 ^b	94,09 ^b	93,36 ^b
Streptomycin sulfate (Strep Gold 70WP)	91,72 ^c	89,34 ^c	88,68 ^c
Fosetyl aluminium (Aliette 800WP)	100,00 ^a	100,00 ^a	99,93 ^a
Đối chứng (nước cất)	-	-	-
CV (%)	1,38	1,60	1,37
LSD _{0,05}	2,04	2,35	2,00

Ghi chú: những chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa, ở mức giá trị 95% theo Duncan.

4. KẾT LUẬN

1. Trên môi trường PDA-PT lỏng, nhiệt độ 30 - 35°C và pH = 7,5 - 8 là điều kiện thích hợp cho loài *P. carotovorum* sinh trưởng và phát triển.

2. Trong phòng thí nghiệm, hoạt chất sinh học Cytosinpeptidemycyn có hiệu lực ức chế vi khuẩn *P. carotovorum* cao nhất đạt 99,26 - 99,61% sau 24 - 72 giờ xử lý. Các hoạt chất hóa học Copper hydroxide,

Oxolinic acid, Quaternary ammonium salts và Fosetyl aluminium có hiệu lực ức chế vi khuẩn *P. carotovorum* cao nhất sau 72 giờ theo dõi đạt 99,93 - 100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trương Thị Chiên, Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Ngọc Lan, Nguyễn Thị Hiền và Trần Bảo Trâm, 2019. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng *Erwinia carotovora* từ đất trồng sâm

- Ngọc Linh tại Quảng Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 61, pp. 32 - 35.
- Hứa Thanh Hải, Nguyễn Huỳnh Cao Quý, Đoàn Thị Kiều Tiên, Lê Thanh Toàn, Mai Văn Trị, Nguyễn Thị Thu Nga, 2020. Xác định tác nhân vi khuẩn gây bệnh loét thân xì mù trên cây mít T (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 19, pp. 72 - 81.
 - Ngô Quang Huy, Nguyễn Mạnh Hùng, Lê Thị Hằng, Phạm Hồng Hiền, Trần Văn Chiến, 2021. Phát hiện và giám định tác nhân gây bệnh thối củ hành bằng kỹ thuật PCR và phân tích trình tự gen *16SrDNA*. Tạp chí Bảo vệ thực vật, 6 (299), pp. 3 - 8.
 - Nguyễn Lê Thanh Mai, Trần Thị Thu Thủy và Lê Minh Tường, 2020. Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) gây bệnh thối nhũn củ khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Tạp chí Bảo vệ thực vật, 2 (289), pp. 10 - 15.
 - Nguyễn Thị Vân, 2010. Nghiên cứu bệnh thối nhũn hành, tỏi và đề xuất biện pháp phòng trừ tại một số địa phương ở Hải Dương. Báo cáo nghiệm thu đề tài.
 - Begot, C., Desnier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C., Lebert A., 1996. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. J Microbiol Methods 25(3):225 - 232.
 - Du Raan, S., Coutinho, T. A., & Van der Waals, J. E., 2016. Cardinal temperature differences, determined in vitro, between closely related species and subspecies of pectinolytic bacteria responsible for blackleg and soft rot on potatoes. European Journal of Plant Pathology, 144: 361 - 369.
 - FAO, 2020. World onion production. <http://faostat.fao.org>.
 - Gavrilovic, V., A. Obradovic and M. Arsenijevic, 2001. Bacterial Soft Rot of Carrot, Parsley and Celery. Plant Pathogenic Bacteria, pp. 269 - 271.
 - Shahbaz, T. S., M. U. Ghazanfar and M. N. Tahir, 2007. Physiology of erwinias associated with black leg of potato. Pak. J. Agri. Sci., Vol. 44(2): 259 - 265.

ABSTRACT

Evaluation of culture conditions and pesticides for controlling bacterial soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* in onion and garlic *in vitro*

In Vietnam, most of onion and garlic fields have been infected bulb rot disease. The causal agent is isolated as Pectobacterium carotovorum causing at all growth stages. This study aimed to investigate the impact of culture media, pH and temperature conditions on the growth of P. carotovorum, as well as the efficacy of chemical and biological pesticides for its control in laboratory conditions. The optimal conditions for P. carotovorum growth were observed on PDA - PT broth, at a pH range of 7,5 to 8 and a temperature of 30 to 35°C. Among the tested chemical pesticides, Copper hydroxide, Oxolonic acid, Quaternary ammonium salts, and Fosetyl aluminum exhibited excellent inhibitory effects, achieving a range of 99.93% to 100% inhibition after 72 hours of treatment. Furthermore, Cytosinepeptidemycin, a biological pesticide, demonstrated the highest efficacy in preventing the growth of P. carotovorum, with a suppression rate of 99.61% after 24 hours of treatment. However, its efficacy gradually declined to 99,38% and 99,26% after 48 and 72 hours, respectively.

Keywords: onion, bulb rot disease, *Pectobacterium carotovorum*.

ĐÁNH GIÁ BỆNH VÀNG LÁ GREENING TRÊN CÂY QUÝT HỒNG (*Citrus reticulata*) TẠI HUYỆN LAI VUNG, TỈNH ĐỒNG THÁP

Lê Minh Tường^{1*}, Đinh Hoàng Kha¹,
Lê Thị Ngọc Xuân¹, Lê Văn Vàng¹

¹Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ
* E-mail liên hệ: lmtuong@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu “Đánh giá bệnh vàng lá Greening trên cây quýt Hồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp” được thực hiện tại phòng thí nghiệm thuộc Khoa Bảo vệ thực vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ nhằm đánh giá, ghi nhận bệnh vàng lá Greening (VLG) trên các vườn quýt Hồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. Tổng số 60 mẫu thí nghiệm (30 mẫu lá và 30 mẫu rễ từ 30 cây quýt Hồng) được thu thập từ 3 nhóm cây (nhóm cây khỏe không có triệu chứng, phát triển bình thường, nhóm cây nghi ngờ có triệu chứng bệnh VLG (triệu chứng không rõ ràng) và nhóm cây có triệu chứng đặc trưng của bệnh VLG) được chẩn đoán bằng dung dịch glugol và kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi IO1-IO2c. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu thí nghiệm đều cho kết quả dương tính với bệnh VLG thông qua gân lá chuyển sang màu đen khi phản ứng với dung dịch glugol và xuất hiện vết băng ở vị trí 1.160 bp khi kiểm tra bằng kỹ thuật PCR bằng cặp mồi IO1-IO2c.

Từ khóa: bệnh vàng lá greening, *Liberobacter asiaticum* (*Candidatus Liberibacter*), kiểm tra bằng dung dịch glugol, kỹ thuật PCR, quýt Hồng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quýt Hồng (*Citrus reticulata* Blanco) là loại cây ăn trái quan trọng, có giá trị kinh tế cao, mang lại thu nhập cao và được trồng từ rất lâu đời ở đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL). Ở khu vực ĐBSCL, nơi trồng nhiều quýt Hồng nhất là huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp, nơi đây giống quýt Hồng đã trở thành đặc sản nổi tiếng của địa phương. Với hương vị chua ngọt đậm đà, màu sắc từ vàng cam đến cam đỏ rất hấp

dẫn và đẹp mắt. Sản phẩm trái cây này từ lâu đã mang lại giá trị kinh tế cao và năm 2021, loài cây này đã được Cục Sở hữu trí tuệ cấp giấy chứng nhận nhãn hiệu, công nhận quýt Hồng là sản phẩm nổi tiếng của Lai Vung. Tuy nhiên, trong những năm gần đây dịch hại trên cây quýt Hồng xuất hiện ngày càng nhiều và khó quản lý, trong đó bệnh vàng lá Greening do vi khuẩn *Liberobacter asiaticum* (*Candidatus liberibacter*) gây ra là một trong những bệnh gây hại quan trọng trên cây quýt Hồng do bệnh làm giảm năng suất, phẩm

Người phân biên: TS. Trương Hồng Hạnh

chất quả và thậm chí dẫn đến chết cây gây thiệt hại nặng về kinh tế cho người nông dân. Hiện nay, có rất ít nghiên cứu về xác định mức độ nhiễm bệnh vàng lá Greening trên cây quýt Hồng tại ĐBSCL nói chung và tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp nói riêng. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần cung cấp thông tin về mức độ nhiễm bệnh vàng lá Greening trên cây quýt Hồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp đồng thời góp phần đưa ra biện pháp phòng trị bệnh một cách hiệu quả.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá và mẫu rễ cây quýt Hồng được thu ngẫu nhiên tại các vườn có diện tích canh tác ít nhất 2.000 m² và cây đang cho trái tại các xã Long Hậu, Tân Thành, Tân Phước thuộc huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp.

Dung dịch glugol: 2 g KI + 1 g I₂ + 100 ml nước cất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên thông tin phỏng vấn và khảo sát trên vườn, mẫu được thu thập trên 30 cây quýt Hồng được phân chia thành 03 nhóm tương ứng (mỗi nhóm 10 cây quýt Hồng, trên mỗi cây quýt Hồng thí nghiệm thu 1 mẫu lá và 1 mẫu rễ) với mức độ thể hiện triệu chứng bệnh vàng lá Greening (VLG) gồm:

+ Nhóm cây khỏe, phát triển bình thường: cây không có triệu chứng, lá phát triển bình thường, gân chính và gân phụ của lá xanh đậm, kích thước lá bình thường.

+ Nhóm cây nghi ngờ nhiễm VLG với triệu chứng không rõ ràng: lá phát triển bình thường nhưng dọc theo gân lá có sự

phát triển của các vết loang lổ màu vàng, kích thước lá không thay đổi.

+ Nhóm cây có triệu chứng đặc trưng của bệnh VLG: lá nhỏ lại, mọc thẳng đứng (hình tai thỏ) hiển thị một loạt điểm mắt màu giống như triệu chứng thiếu kẽm, những đường gân lá có màu xanh trong khi thịt lá thì có màu vàng.

Tại mỗi điểm khảo sát, quan sát toàn cây và ở mỗi cây quan sát kỹ theo 4 hướng, mỗi hướng quan sát 3 cành và tiến hành thu mẫu:

* Đối với 1 mẫu lá: trên cây được chọn tiến hành thu 12 lá ở 4 cành tương ứng với 4 hướng (3 lá/cành), lá được thu không thể hiện triệu chứng của nấm bệnh hay côn trùng gây hại.

* Đối với 1 mẫu rễ: tại mỗi cây được chọn, tiến hành thu 20 g rễ tương ứng với 4 hướng (xới đất theo chu vi của tán lá để thu 5 g rễ/hướng).

Mẫu lá và mẫu rễ thu được cho vào túi nylon riêng có ghi ký hiệu và trữ ở 4°C để tiến hành cho các thí nghiệm sau.

2.2.1. Chẩn đoán bệnh vàng lá Greening bằng dung dịch glugol

- Thực hiện trên 30 mẫu lá cây quýt Hồng (mỗi cây 1 mẫu lá) thể hiện 03 nhóm cây tương ứng với mức độ thể hiện triệu chứng bệnh vàng lá Greening (VLG) đã mô tả bên trên.

- Khử trùng bề mặt lá bằng cồn 70 độ và dùng lưới lam cạo phần gân chính gân cuống lá.

- Đặt mẫu lên nền giấy trắng và nhỏ 1 giọt dung dịch glugol lên vị trí đã cạo và trải đều, chờ khoảng 5 phút để ghi nhận kết quả: (1): nếu xuất hiện màu đen đậm là cây đã bị bệnh (dương tính); (2): nếu thấy nâu nhạt là cây không bị bệnh (âm tính).

2.2.2. Chẩn đoán bệnh vàng lá Greening bằng kỹ thuật Polymerase chain reaction (PCR)

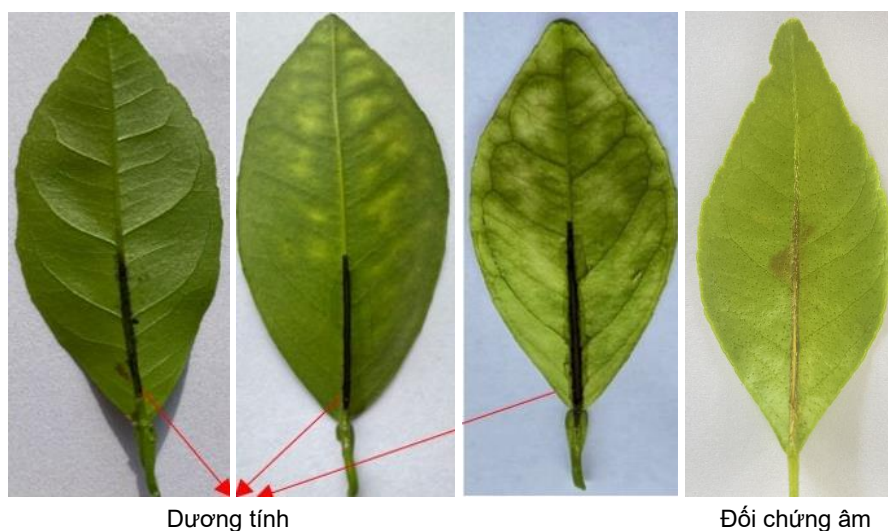
Mẫu lá và mẫu rễ cây quýt Hồng thu thập ở ngoài đồng được sử dụng để ly trích DNA với từng mẫu riêng lẻ. DNA tổng số của các mẫu lá và rễ thí nghiệm được chiết xuất theo phương pháp của Ruangwong and Akarapisan (2006) và sử dụng cặp mồi IO1 (5'GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGGCA 3') và IO2c (5'GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCAT 3') để khuếch đại đoạn gene có kích thước khoảng 1.160 bp (Ruangwong and Akarapisan, 2006). Thành phần một phản ứng PCR bao gồm: DNA tổng số của mẫu lá hoặc mẫu rễ (100 ng): 2,0 μ L; mồi xuôi IO1 (0,5 μ M): 1,0 μ L; mồi ngược IO2c (0,5 μ M): 1,0 μ L; My mix Taq DNA

(0,5 μ M): 9,0 μ L. Phản ứng PCR với chu kỳ nhiệt: 92°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (92°C trong 1 phút, 55°C trong 45 giây và 72°C trong 70 giây), 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel 1,5% và chụp hình dưới tia UV.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chẩn đoán bệnh vàng lá Greening bằng dung dịch glugol

Tổng cộng 30 mẫu lá cây quýt Hồng được chẩn đoán bệnh vàng lá greening bằng dung dịch glugol, kết quả cho thấy tất cả các mẫu thí nghiệm đều xuất hiện vết màu đen đậm trên gân chính gân cuống lá (hình 1), điều này có nghĩa các mẫu cho kết quả dương tính với bệnh vàng lá Greening.

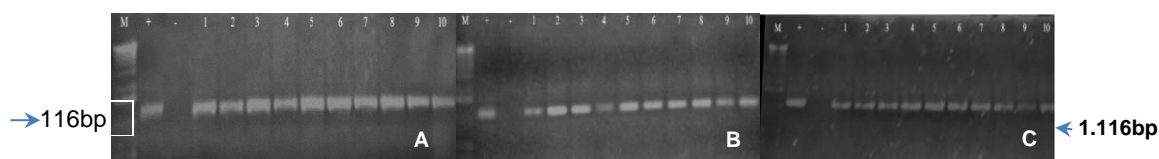


Hình 1. Kiểm tra bệnh vàng lá Greening các mẫu lá cây quýt Hồng bằng dung dịch glugol

3.2. Chẩn đoán bệnh Greening trên cây quýt Hồng bằng kỹ thuật PCR

Kết quả sử dụng phản ứng PCR trên mẫu DNA của mẫu lá và mẫu rễ cho thấy các mẫu lá và mẫu rễ thí nghiệm đều xuất hiện kết quả dương tính với Greening. Ở cả 3 nhóm cây thực hiện thí nghiệm

(nhóm cây khỏe phát triển bình thường, nhóm cây bệnh nghi ngờ nhiễm VLG và nhóm cây có triệu chứng đặc trưng của bệnh VLG) đều cho sản phẩm PCR với các mẫu được khuếch đại ở kích thước bằng của sản phẩm khoảng 1.160 bp (hình 2).



Hình 2. Sản phẩm điện di trên gel agarose 1,5%

Ghi chú: M: 1 kbp Ladder, (-): đối chứng âm, (+): đối chứng dương.

(A): nhóm cây phát triển bình thường (không có triệu chứng bệnh): 1 - 5: mẫu lá, 6 - 10: mẫu rễ;

(B): nhóm cây nghi ngờ có triệu chứng bệnh VLG: 1 - 5: mẫu lá, 6 - 10: mẫu rễ;

(C): nhóm cây có biểu hiện triệu chứng bệnh VLG: 1 - 5: mẫu lá, 6 - 10: mẫu rễ.

Tóm lại, 60 mẫu thí nghiệm (30 mẫu lá và 30 mẫu rễ từ 30 cây quýt Hồng thí nghiệm) thu trên 3 nhóm cây (nhóm cây phát triển bình thường, nhóm cây có triệu chứng nghi ngờ nhiễm VLG và nhóm cây có triệu chứng đặc trưng của bệnh VLG), qua kiểm tra bằng dung dịch glugol và kỹ thuật PCR với khi sử dụng cặp mồi IO1-IO2c cho thấy các mẫu lá và mẫu rễ thí nghiệm đều dương tính với vi khuẩn gây bệnh vàng lá Greening.

Trên thực tế, bệnh vàng lá Greening có thời gian ủ bệnh lâu, cây trồng sau khi nhiễm bệnh thường có thời gian ủ bệnh từ 6 tháng đến 2,5 năm (Garnier and Bové, 1996). Trong thời gian ủ bệnh, cây trồng không có bất kỳ triệu chứng nào thể hiện ra ngoài, do đó gây rất nhiều khó khăn trong công tác phòng trừ bệnh hại (Bové, 2006). Triệu chứng bệnh thường biểu hiện rõ nhất sau 3 - 5 năm trồng, khi biểu hiện ra triệu chứng không gây chết cây ngay mà cây vẫn có thể duy trì sức sống sau nhiều năm (Brlansky and Rogers, 2007). Như vậy, các mẫu lá, rễ thu trên cây quýt Hồng phát triển bình thường vẫn cho kết quả dương tính là hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu của Garnier and Bové (1996), Bové (2006), Brlansky and Rogers (2007). Điều đó cũng có nghĩa là các cây quýt Hồng này đã nhiễm vi khuẩn gây bệnh VLG tuy nhiên vẫn còn trong thời gian ủ bệnh nên cây chưa thể hiện triệu chứng.

Do vậy, việc giám định nhằm phát hiện sớm bệnh vàng lá Greening trên cây quýt Hồng nói riêng và cây có múi nói chung là hết sức cần thiết, nó đóng vai trò quan trọng trong việc quản lý bệnh, giảm thiểu thiệt hại về kinh tế đối với người dân và phương pháp này đã được nhiều quốc gia sử dụng. Theo kết quả nghiên cứu của Jagouei *et al.* (1996) cũng sử dụng cặp mồi OI1/OI2c để phát hiện vi khuẩn *Liberobacter asiaticum* và *Liberobacter africanum* gây bệnh vàng lá Greening trên cây có múi và sản phẩm khuếch đại ở vị trí 1.160 bp. Tương tự, Ruangwong and Akarapisan (2006), sử dụng cặp mồi OI1/OI2c để phát hiện vi khuẩn *Candidatus Liberibacter spp.* gây bệnh vàng lá Greening trên cây có múi ở Thái Lan.

Tuy nhiên, do số lượng mẫu thí nghiệm chưa đủ lớn và vùng khảo sát thu mẫu để thực hiện thí nghiệm chưa nhiều cho nên việc cần thiết là phải tiếp tục thu mẫu với số lượng nhiều hơn, thu mẫu, khảo sát bệnh ở nhiều địa phương khác nhau trong vùng để đánh giá được mức độ phổ biến, mức độ gây hại,... của bệnh vàng lá Greening trên cây quýt Hồng tại Đồng Tháp nói riêng và vùng ĐBSCL nói chung từ đó mới có cơ sở khẳng định chính xác và đưa ra biện pháp phòng trị bệnh hiệu quả.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Phương pháp chẩn đoán bằng dung dịch glugol cũng như bằng kỹ thuật PCR đã xác định tất cả 60 mẫu thí nghiệm (30 mẫu lá và 30 mẫu rễ thu thập từ 30 cây quýt Hồng thí nghiệm) ở các nhóm cây khỏe, cây có triệu chứng nghi ngờ và nhóm cây có triệu chứng đặc trưng của bệnh vàng lá Greening tại các xã Long Hậu, Tân Thành, Tân Phước, huyện Lai Vung đều cho kết quả dương tính với nhiễm vi khuẩn *Liberobacter asiaticum* gây bệnh vàng lá Greening.

4.2. Đề nghị

Cần tiếp tục khảo sát với số lượng mẫu nhiều hơn và ở những địa phương khác nhau để có cơ sở khẳng định chính xác mức độ nhiễm bệnh Greening trên cây quýt Hồng canh tác ở huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp nói riêng và vùng ĐBSCL nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bové, J.M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly - emerging, century - old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7 - 37.
2. Brlansky, R.H., and M.E. Rogers, 2007. Citrus Huanglongbing: Understanding the Vector - Pathogen Interaction for Disease Management. *APSnet Features*, 1 - 9.
3. Garnier, M. and J.M. Bové, 1996. Distribution of the huanglongbing (greening) liberobacter species in fifteen African and Asian countries. International Organization of Citrus. *Virologists Conference Proceedings* 13: 388 - 391.
4. Jagoueix S, J.M, Bové and M. Garnier, 1996. PCR detection of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*, 10: 43 - 50
5. Ruangwong, O. and A. Akarapisan, 2006. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticum* causing Citrus Huanglongbing disease. *Journal of Agricultural Technology*, 2(1): 111 - 120.

ABSTRACT

Evaluation of Greening disease on Hong Mandarin variety Oranges (*Citrus reticulata*) in Lai Vung district, Dong Thap province

The research "Evaluation of Greening disease on Hong Mandarin variety Oranges (*Citrus reticulata*) in Lai Vung district, Dong Thap province" was carried out at laboratory of Plant Protection Faculty, College of Agriculture, Cantho university to diagnose Greening disease on Hong Mandarin variety oranges in Lai Vung district, Dong Thap province. A total of 60 samples (30 leaf samples and 30 root samples from 30 Hong Mandarin tree) were collected from 3 different groups (plants with normal growth (no symptom), plants with suspected disease symptoms (symptoms are not obvious) and plants with typical disease symptoms) were diagnosed by glugol test and PCR technique using primer IO1-IO2c. The results indicated that all samples tested positive for glugol test and showed a band at 1.160 bp when tested by PCR technique with primer pair IO1-IO2c.

Keywords: *Liberobacter asiaticum*, *Candidatus Liberibacter*, glugol test, Greening disease, Hong Mandarin variety Oranges, PCR technique.

KHẢO SÁT HOẠT CHẤT POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA LÁ LÚA BỊ BỆNH BẠC LÁ DO *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KHI KÍCH KHÁNG BẰNG DỊCH TRÍCH LÁ SỐNG ĐỜI

Nguyễn Đức Độ^{1*}, Đỗ Văn Tuyền¹,
Phạm Trần Tuyết Mai¹, Nguyễn Thái Phúc Thịnh¹,
Nguyễn Đắc Khoa¹, Trương Văn Xạ²

¹ Trường Đại học Cần Thơ

² Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long
E-mail liên hệ: nddo@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Các nhóm chất polyphenol tổng, flavonoid tổng và khả năng kháng oxy hóa của dịch trích lá lúa được phân tích khi cây lúa có và không chủng với mầm bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra. Kết quả khi ngâm hạt bằng dịch trích nước lá sống đời sẽ giúp cây lúa tăng hàm lượng polyphenol, flavonoid cao hơn so với cây lúa bình thường. Thời điểm khảo sát thì hàm lượng polyphenol tổng trong lá lúa giảm liên tục từ 0 đến 21 NSCB; hàm lượng flavonoid tổng trong lá lúa tăng ở giai đoạn 0 - 7 NSCB, sau đó giảm đến 21 NSCB. Khi cây lúa bị mầm bệnh Xoo tấn công thì khả năng khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH đều ghi nhận xu hướng giảm từ 0 - 21 NSCB. Khi ngâm hạt bằng dịch trích nước lá sống đời kết hợp chủng bệnh thì khả năng khử gốc tự do DPPH giữ ổn định ở giai đoạn đầu, sau đó giảm mạnh đến 21 NSCB. Ngược lại, khả năng khử ion Fe^{3+} lại giảm mạnh ở thời điểm từ 0 - 7 NSCB, sau đó ổn định đến 21 NSCB.

Từ khóa: bệnh bạc lá, kháng oxy hóa, polyphenol tổng, flavonoid tổng, sống đời.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn Gram âm *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra (Swings *et al.*, 1990). Bệnh được phát hiện khắp nơi trên thế giới và gây thiệt hại cho ngành sản xuất lúa gạo (Ejaz *et al.* 2022; Verdier *et al.* 2012). Bệnh làm giảm năng suất từ 20 - 50% đối với

giống lúa có gen kháng và lên đến 75% đối với giống lúa nhiễm (Tian *et al.*, 2014; Verdier *et al.*, 2012). Ở Việt Nam, bệnh phát triển mạnh trên các vụ lúa hè thu, thu đông và giảm đến 65% năng suất; ngoài ra bệnh còn gây ảnh hưởng đến độ đồng đều, màu sắc của hạt... từ đó tác động đến chất lượng gạo (Dinh *et al.*, 2008; Nguyễn Đắc Khoa, 2018).

Người phân biện: PGS.TS. Nguyễn Minh Chơn

Theo Khoa *et al.* (2017), ngâm hạt lúa bằng dịch trích nước lá sống đời (*K. pinnata*) có hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa lên đến 40%. Cơ chế kích kháng trên có liên quan đến khả năng làm giảm bệnh khứa cạnh sinh hóa đã được khảo sát như enzyme PO, CAT tăng cao khi được xử lý với dịch trích, càng tăng sớm và mạnh hơn khi có xuất hiện mầm bệnh. Bên cạnh đó, trong cây lúa có thể tích lũy một lượng lớn các chất chuyển hóa thứ cấp như phenolic acid, flavonoid, tannin và coumarin (Walter and Marchesan, 2011). Các hợp chất này được xem như là chất kháng oxy hóa tự nhiên do có khả năng loại bỏ các gốc tự do được sinh ra do stress oxy hóa hoặc sự tấn công của mầm bệnh (Degirmenci and Erkurt, 2020; Walter and Marchesan, 2011; Wojdylo *et al.*, 2007). Như vậy, dịch trích nước lá sống đời đã được chứng minh có hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa thông qua cơ chế kích kháng

cây lúa bằng biện pháp ngâm hạt. Nghiên cứu này có thể là bước đầu cho những nghiên cứu chuyên sâu hơn nhằm tìm hiểu về khả năng kích kháng bệnh bạc lá lúa khi ngâm hạt bằng dịch trích lá sống đời thông qua hàm lượng một số hợp chất nhóm polyphenol trong lá lúa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống lúa Jasmine 85 (Viện Lúa đồng bằng Sông Cửu Long) và vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) của nhóm nghiên cứu bệnh học thực vật Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, gồm 8 nghiệm thức như trình bày ở bảng 1, tiến hành thí nghiệm mô tả theo Khoa *et al.* (2017).

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm với các nghiệm thức và cách xử lý

Nghiệm thức	Biện pháp xử lý (cách chủng bệnh, ngâm hạt và nồng độ % dịch trích lá sống đời)	Ký hiệu
(1)	Cây lúa bình thường	Đối chứng nền
(2)	Cây lúa có chủng bệnh	Đối chứng âm
(3)	Cây lúa có ngâm hạt bằng dịch trích 1% và không chủng bệnh	Sống đời 1 - KCB
(4)	Cây lúa có ngâm hạt bằng dịch trích 1% và có chủng bệnh	Sống đời 1 - CB
(5)	Cây lúa có ngâm hạt bằng dịch trích 1,5% và không chủng bệnh	Sống đời 1,5 - KCB
(6)	Cây lúa có ngâm hạt bằng dịch trích 1,5% và có chủng bệnh	Sống đời 1,5-CB
(7)	Cây lúa có ngâm hạt bằng dịch trích 2% và không chủng bệnh	Sống đời 2 - KCB
(8)	Cây lúa có ngâm hạt bằng dịch trích 2% và có chủng bệnh	Sống đời 2-CB

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân tích các hợp chất polyphenol trong lá lúa và sống đời

Thí nghiệm trên lúa như cách chuẩn bị, tiến hành và phân tích theo N.L.T. Nhã

(2022). Cao chiết lá sống đời được ly trích bằng phương pháp lỏng - lỏng theo Kagale *et al.* (2004). Quy trình ly trích cao chiết được thực hiện theo mô tả của Đ.V. Tù (2022). Phương pháp định lượng

polyphenol tổng trong mẫu lá lúa được thực hiện theo phương pháp của Yadav (2011) và hiệu chỉnh theo H.T.Duy (2020). Phương pháp định lượng flavonoid tổng của Chang *et al.* (2002) và Saeed *et al.* (2012).

2.2.2. Phương pháp khảo sát khả năng kháng oxy hóa với gốc tự do DPPH và phương pháp khử ion Fe^{3+} của dịch trích lá lúa

Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH của các nghiệm thức được thực hiện theo phương pháp của Kedare and Singh (2011). Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử ion Fe^{3+} , Oyaizu (1986) và hiệu chỉnh theo H.T. Duy (2020).

2.2.3. Phân tích số liệu

Các giá trị trung bình hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng và kháng oxy hóa được phân tích ANOVA và so sánh qua kiểm định Tukey bằng phần mềm Minitab 16.0.

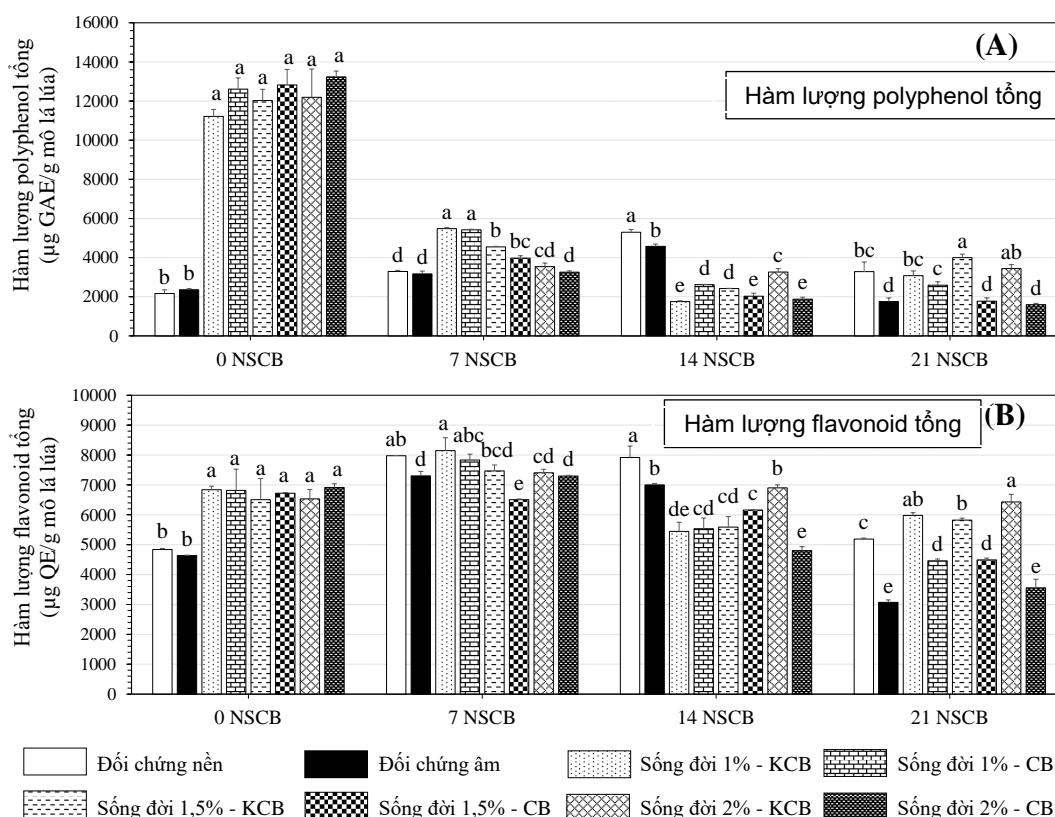
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hàm lượng polyphenol, flavonoid trong mẫu lá lúa ở giai đoạn 0, 7, 14 và 21 NSCB

Ở 0 NSCB là thời điểm chưa có sự xuất hiện của vi khuẩn *Xoo* thì mức polyphenol và flavonoid của đối chứng nền và đối chứng âm có giá trị tương đương nhau. Trong khi đó, các nghiệm thức có xử lý sống đời đều ghi nhận lượng polyphenol và flavonoid cao hơn so với 2

đối chứng. Như vậy, có thể là việc dùng sống đời đã giúp cây lúa tăng lượng polyphenol và flavonoid cao hơn so với cây lúa bình thường. Ở 7 NSCB, khi có sống đời đều ghi nhận lượng polyphenol đều thấp hơn so với 0 NSCB, còn nồng độ flavonoid thì ngược lại. Tuy nhiên, nồng độ polyphenol và flavonoid khi dùng sống đời kết hợp chủng bệnh (1,5-CB và 2-CB) đều ghi nhận thấp hơn khi không chủng bệnh (1,5 - KCB và 2 - KCB).

Theo Khoa *et al.* (2017), khi xử lý sống đời nồng độ 1,5% trở lên cho hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá lúa đến 21 NSCB. Trong nghiên cứu này cho thấy dùng sống đời nồng độ 1,5% và 2% thì hàm lượng polyphenol và flavonoid cao hơn so với nghiệm thức ngâm hạt bằng nước. Do đó, có thể thấy sự liên quan giữa khả năng giảm bệnh cháy bìa lá lúa với hàm lượng 2 hợp chất này ở các nghiệm thức có ngâm hạt bằng sống đời. Kết quả nghiên cứu này cũng ghi nhận tương tự như nghiên cứu của Nisha *et al.* (2012) và Kagale *et al.* (2004), hàm lượng nhóm chất polyphenol trong cây lúa tăng cao ở giai đoạn từ 0 đến 96 giờ sau chủng bệnh với vi khuẩn *Xoo*; sau đó giảm đến thời điểm khảo sát là 120 giờ. Theo Cho and Lee (2015), các hợp chất thuộc nhóm polyphenol trong cây lúa có thể góp phần biểu hiện đặc tính kháng bệnh hay miễn cảm với mầm bệnh của cây lúa; thông thường ở các giống lúa kháng bệnh thì hàm lượng polyphenol sẽ tăng lên khi mầm bệnh tấn công và xâm nhiễm; xu hướng này ngược lại ở giống lúa miễn cảm với mầm bệnh.



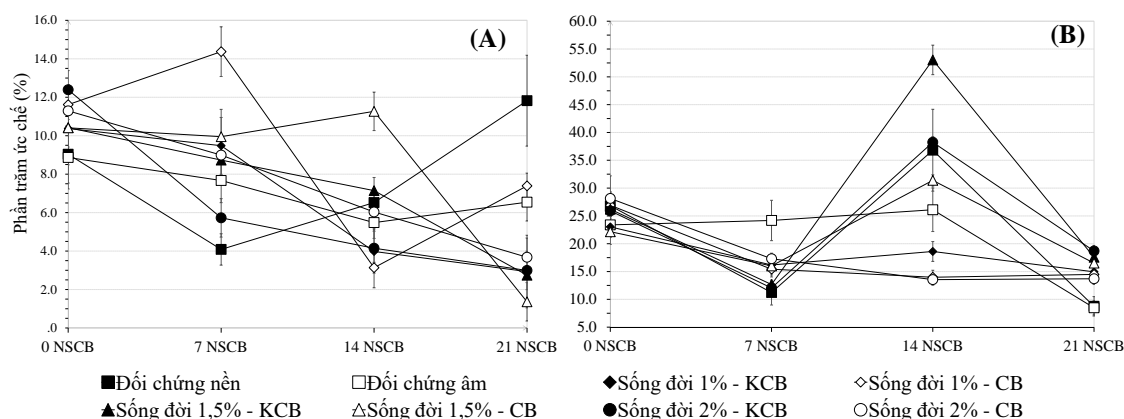
Hình 1. Hàm lượng các nhóm chất polyphenol có trong mẫu lá lúa ở thời điểm 0, 7, 14 và 21 NSCB

3.2. Khả năng kháng oxy hóa của dịch trích lá lúa ở giai đoạn 0, 7, 14 và 21 NSCB

3.2.1. Khả năng khử gốc tự do DPPH

Đối với nghiệm thức đối chứng nền thì khả năng khử DPPH ghi nhận giảm từ 9,0% (0 NSCB) xuống 4,1% (7 NSCB), sau đó tăng liên tục đến mức 11,8% (21 NSCB). Trong khi đó, nghiệm thức đối chứng âm lại ghi nhận xu hướng giảm liên tục từ 8,9% (0 NSCB) xuống 5,5% (14 NSCB), sau đó tăng đến mức 6,5% (21 NSCB). Như vậy, khả năng khử DPPH của nghiệm thức nền và nghiệm thức đối chứng âm đều chung xu hướng giảm theo thời gian từ 0 - 7 NSCB; nhưng mức giảm của nghiệm thức đối chứng nền nhiều hơn so với nghiệm thức đối chứng âm. Kết quả

này có thể là do mầm bệnh *Xoo* tấn công vào cây lúa đã kích thích cây lúa tăng khả năng khử DPPH cao hơn so với cây lúa bình thường. Đối với các nghiệm thức có ngâm hạt bằng dịch trích nước lá sống đời, không chủng bệnh đều ghi nhận khả năng khử gốc tự do DPPH có xu hướng giảm từ 0 đến 21 NSCB. Đối với các nghiệm thức có ngâm hạt bằng dịch trích nước lá sống đời và có chủng bệnh thì khả năng khử DPPH có xu hướng giữ ổn định ở giai đoạn 0 đến 7 NSCB; sau đó giảm theo xu hướng của nghiệm thức âm. Cụ thể, khả năng khử DPPH nghiệm thức sống đời 1 - CB ghi nhận từ 11,6% , 14,4% , và 4,0% (ở 0, 7 và 14 NSCB). Trong khi đó, nghiệm thức lá sống đời 2-CB ghi nhận khả năng khử DPPH giảm liên tục từ 0 đến 21 NSCB.



Hình 2. Khả năng kháng oxy hóa với DPPH (A) và ion Fe³⁺ (B) của lá lúa ở 0, 7, 14 và 21 NSCB

Khi ngâm hạt bằng dịch trích nước lá sống đời ghi nhận khả năng khử DPPH mạnh hơn so với hai nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nồng độ dịch trích càng cao (1%, 1,5% và 2%) thì khả năng kháng oxy hóa được ghi nhận càng mạnh. Như vậy, ngâm hạt bằng sống đời có thể đã kích thích cây lúa tăng các chất có khả năng khử DPPH mạnh hơn so với cây lúa ngâm hạt bằng nước.

3.2.2. Khả năng khử ion Fe³⁺

Đối với nghiệm thức đối chứng nền, nghiên cứu ghi nhận khả năng khử ion Fe³⁺ giảm từ 26,8% (0 NSCB) xuống 11,2% (7 NSCB), sau đó tăng mạnh đến 36,8% (14 NSCB). Trong khi đó, nghiệm thức đối chứng âm ghi nhận khả năng khử ion Fe³⁺ luôn có xu hướng giữ cân bằng ở thời điểm từ 0 đến 14 NSCB, sau đó giảm mạnh ở 21 NSCB. Như vậy, mầm bệnh *Xoo* có thể đã tác động cây lúa tăng khả năng khử ion Fe³⁺ so với cây lúa bình thường; và đó có thể là phản ứng cây lúa nhằm kháng lại mầm bệnh này. Tương tự như nghiệm thức đối chứng nền, các nghiệm thức có ngâm hạt bằng dịch trích

nước lá sống đời, không chủng bệnh (sống đời 1%, 1,5% và 2% - KCB) đều ghi nhận cùng xu hướng giảm ở thời điểm từ 0 đến 7 NSCB, sau đó tăng mạnh ở thời điểm 14 NSCB. Còn đối với các nghiệm thức ngâm hạt bằng dịch trích nước lá sống đời 1% và 2%, có chủng bệnh, nghiên cứu ghi nhận khả năng khử ion Fe³⁺ giảm từ 0 đến 7 NSCB, sau đó giữ ổn định đến 21 NSCB. Như vậy, nếu so sánh hai nghiệm thức này với nghiệm thức đối chứng âm thì khả năng khử ion Fe³⁺ tăng và giảm khác nhau ở các thời điểm khảo sát. Cụ thể, khả năng khử ion Fe³⁺ của hai nghiệm thức (sống đời 1% và 2% - CB) giảm từ 0 đến 7 NSCB, sau đó giữ cân bằng đến 21 NSCB. Trong khi đó, khả năng khử ion Fe³⁺ của nghiệm thức đối chứng âm giữ ổn định ở giai đoạn từ 0 đến 14 NSCB, sau đó giảm mạnh ở 21 NSCB.

Nếu so sánh khả năng khử ion Fe³⁺ với khả năng khử DPPH của cây lúa trước sự tấn công của mầm bệnh giảm từ 0 đến 21 NSCB (hình 2A, 2B). Khi có xử lý sống đời thì ghi nhận khả năng khử ion Fe³⁺ và DPPH tương đương so với cây lúa không xử lý. Nhưng khi xử lý sống đời và

bị bệnh *Xoo* ở thì khả năng khử DPPH và Fe^{3+} khác nhau. Cụ thể, khả năng khử DPPH giữ ổn định ở giai đoạn đầu khi xuất hiện mầm bệnh (từ 0 đến 7 NSCB) quanh giá trị từ 10,4 - 14,4%, sau đó giảm mạnh đến 21 NSCB (hình 2A). Trong khi đó, khả năng khử ion Fe^{3+} giảm mạnh từ 0 đến 7 NSCB, sau đó giữ ổn định đến 21 NSCB (hình 2B). Theo Walter and Marchesan (2011) và Wojdylo *et al.* (2007), hàm lượng các hợp chất polyphenol, flavonoid, coumarin tồn tại trong cây lúa tỉ lệ với khả năng kháng oxy hóa. Theo Ab Rahman *et al.* (2014), khả năng kháng oxy hóa của cây lúa luôn duy trì mức độ tăng từ khi mầm bệnh tấn công đến biểu hiện bệnh (120 giờ sau chủng bệnh), xu hướng tăng này tỉ lệ với hàm lượng polyphenol, tannin và flavonoid trong lá lúa.

4. KẾT LUẬN

Khi ngâm hạt lúa bằng dịch trích lá sống đời sẽ giúp tăng hàm lượng polyphenol, flavonoid hơn so với cây lúa bình thường. Ở các cây lúa bệnh thì ghi nhận polyphenol và flavonoid thấp hơn so với cây lúa không bệnh. Kết quả polyphenol tổng trong lá lúa giảm qua giai đoạn từ 0, 7, 14 và 21 NSCB, khi có ngâm hạt bằng sống đời kết hợp với chủng bệnh thì polyphenol giảm mạnh nhất. Hàm lượng flavonoid tổng tăng ở giai đoạn đầu khi mầm bệnh *Xoo* tấn công (0 - 7 NSCB), sau đó giảm 21 NSCB. Khi mầm bệnh *Xoo* tấn công thì khả năng khử ion Fe^{3+} và gốc tự do DPPH giảm từ 0 đến 21 NSCB. Đối với cây lúa xử lý với sống đời và có bệnh thì khả năng khử DPPH ít biến thiên, sau đó giảm mạnh đến 21 NSCB; khả năng khử ion Fe^{3+} giảm mạnh ở thời điểm từ 0 đến 7 NSCB, sau đó giữ ổn định đến 21 NSCB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ab Rahman, S.F.S., Sijam, K. and Omar, D., 2014. Identification and antibacterial activity of phenolic compounds in crude extracts of *Piper sarmentosum* (Kadok). *J. Pure Appl. Microbiol*, 8, 483 - 490.
2. Cho, M.H. and Lee, S.W., 2015. Phenolic Phytoalexins in Rice: Biological Functions and Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29120 - 29133.
3. Degirmenci, H. and Erkurt, H., 2020. Chemical profile and antioxidant potency of *Citrus aurantium* L. flower extracts with antibacterial effect against foodborne pathogens in rice pudding. *Lwt*, 126, 109273.
4. Dinh, H.D., Oanh, N.K., Toan, N.D., Du, P. Van and Loan, L.C., 2008. Pathotype profile of *X. oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice ecosystem in Cuu Long river Delta. *Omonrice*, 16, 34 - 40.
5. Duy, H.T., Dũ, L.P., Thành, N.V. and Độ, N.Đ., 2020. Khảo sát thành phần hóa học và khả năng kháng oxy hóa của các phân đoạn cao chiết lá già từ cây bình bát nước (*A. glabra* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 4(1), 1668 - 1678.
6. Ejaz, K., Faiq, A., Asif, M., Asif, M., Zaka, A., Nguyen, M.H., *et al.*, 2022. Molecular characterization and screening of *X. oryzae* pv. *oryzae*, isolated from Pakistan for prediction of bacterial leaf blight - resistant Basmati rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101858.
7. Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R. and Samiyappan, R., 2004. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 91 - 100.
8. Kedare, S.B. and Singh, R.P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412 - 422.
9. Khoa, N.Đ., Xà, T.V. and Hào, L.T., 2017. Disease - reducing effects of aqueous leaf extract of *K. pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *Xoo* involve induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100, 57 - 66.

10. Nguyễn Lâm Trang Nhã, 2022. Khảo sát hàm lượng các hợp chất nhóm polyphenol và khả năng kháng oxy hóa từ cây lúa (*Oryza sativa* L.) sau khi kích kháng. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Cần Thơ.
11. Đỗ Văn Tuyền, 2022. Khảo sát hàm lượng các hợp chất tự nhiên và khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ lá cây sống đời (*Kalanchoe pinnata*). Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Cần Thơ.
12. Nisha, S., Revathi, K., Chandrasekaran, R., Kirubakaran, S.A., Sathish - Narayanan, S., Stout, M.J. and Senthil - Nathan, S., 2012. Effect of plant compounds on induced activities of defense - related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. *Physiological and molecular plant pathology*, 80, 1 - 9.
13. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307 - 315.
14. Saeed, N., Khan, M.R. and Shabbir, M., 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 221.
15. Swings, J., Van Den Mooter, M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T.W. and Kersters, K., 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*X. campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*X. campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *X. oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 309 - 311.
16. Tian, Y., Zhao, Y., Xu, R., Liu, F., Hu, B. and Walcott, R.R., 2014. Simultaneous detection of *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* in rice seed using a padlock probe - based assay. *Phytopathology*, 104(10), 1130 - 1137.
17. Verdier, V., Vera Cruz, C. and Leach, J.E., 2012. Controlling rice bacterial blight in Africa: Needs and prospects. *Journal of Biotechnology*, 159(4), 320 - 328. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.020>
18. Walter, M. and Marchesan, E., 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 371 - 377. <https://doi.org/10.1590/S1516 - 89132011000200020>
19. Wojdylo, A., Oszmianski, J. and Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940 - 949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
20. Yadav, R.N.S. and Agarwala, M., 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytology*, 3(12).

ABSTRACT

Evaluation of total polyphenolic compounds and antioxidant activities in rice leaves inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial leaf blight and treated with aqueous *Kalanchoe pinnata* leaf extracts using seed soaking

*This study aimed to evaluate the total polyphenols, total flavonoids and antioxidant activities of rice leaf extracts when rice plants were inoculated and un-inoculated with rice blight. The total polyphenol content in rice leaves decreased continuously from 0 to 21 day after inoculated (DAI). The total Flavonoid content in rice leaves increased synthesis at 0 - 7 DAI, then decreased to 21 DAI. When rice plants were inoculation, antioxidant activities (Fe^{3+} , DPPH) of rice leaves all recorded a decreasing trend from 0 to 21 DAI. In particular, in the treatment of soaking seeds with *K. pinnata* aqueous leaf extract and inoculation, the DPPH free radical remained stable at the initial stage when pathogens appeared, then sharply decreased to 21 DAI. In contrast, the ability to reduce Fe^{3+} ions strongly decreased at the time from 0 to 7 DAI, then stabilized to 21 DAI.*

Keywords: antioxidant activities, bacterial leaf blight, *Kalanchoe pinnata*, total polyphenols, total flavonoids.

KHẢ NĂNG VÀ CƠ CHẾ KÍCH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ KHI NGÂM HẠT GIỐNG KẾT HỢP PHUN LÊN LÁ LÚA DỊCH TRÍCH LÁ CỎ CÚT HEO (*Ageratum conyzoides*)

Trương Văn Xạ¹, Trần Minh Hiền², Nguyễn Đắc Khoa^{2*}

¹ Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

² Trường Đại học Cần Thơ

* E-mail liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát khả năng và cơ chế kích kháng bệnh bạc lá (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) gây ra khi ngâm hạt giống kết hợp phun lên lá lúa dịch trích lá cỏ cút heo (*Ageratum conyzoides*) trong điều kiện nhà lưới. Ba nồng độ dịch trích gồm 1%, 2% và 3% (w/v) được sử dụng để ngâm hạt và phun lá. Lá lúa được phun ở hai thời điểm 7 và 14 ngày trước chủng bệnh (NTCB). Hai nghiệm thức kết hợp ngâm hạt 2% + phun lá 3% 7 NTCB và ngâm hạt 2% + phun lá 1% 7 NTCB có hiệu quả giảm bệnh khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không xử lý, trong đó nghiệm thức kết hợp ngâm hạt 2% + phun lá 3% 7 NTCB có hiệu quả cao nhất ở cả ba thời điểm 7, 14 và 21 ngày sau chủng bệnh. Hiệu quả giảm bệnh có liên quan đến cơ chế kích kháng do hoạt tính của bốn enzyme liên quan đến cơ chế kháng bệnh bạc lá gồm peroxidase, catalase, polyphenol oxidase và phenylalanine ammonia lyase tăng khi hạt và lá lúa được xử lý với dịch trích cỏ cút heo, đặc biệt khi có sự hiện diện của mầm bệnh.

Từ khóa: *Ageratum conyzoides*, bạc lá, kích kháng, lúa, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

1. GIỚI THIỆU

Bệnh bạc lá lúa (cháy bìa lá) do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra (Swings *et al.*, 1990), là một trong những nguyên nhân chính làm giảm năng suất lúa và thiệt hại lớn về kinh tế cho các vùng trồng lúa, đặc biệt là ở châu Á (Mew *et al.*, 1993).

Phun thuốc hóa học là phương pháp nông dân thường hay sử dụng để đối phó với bệnh bạc lá lúa. Tuy nhiên giá cả phân bón, thuốc hóa học tăng cao và nếu sử dụng thuốc hóa học quá liều sẽ tích tụ gây ô nhiễm môi trường, đồng thời ảnh hưởng đến sức khỏe nông dân và người tiêu dùng (Schantz *et al.*, 2001). Một trong những biện pháp quản lý bệnh bạc lá lúa là lai tạo các giống lúa mang gen kháng Xoo (Bhasin *et al.*, 2012). Tuy nhiên, giống lúa mang gen kháng thường chỉ có hiệu quả

canh tác trong thời gian ngắn vì quần thể vi khuẩn dễ đột biến làm xuất hiện các chủng vi khuẩn mang độc tính cao hơn vi khuẩn ban đầu (Leach *et al.*, 2001; McDonald and Linde, 2002). Bên cạnh đó, việc tạo ra một giống kháng sẽ tiêu tốn rất nhiều thời gian và chi phí, vì vậy giá của một giống lúa kháng sẽ cao hơn nhiều so với một giống lúa bình thường, điều đó tạo thêm khó khăn cho nông dân trong việc mua và trồng các giống lúa kháng (Khoa *et al.*, 2011). Sử dụng vi sinh vật đối kháng để quản lý bệnh cũng là một hướng nghiên cứu đang được quan tâm. Một số nghiên cứu đang được tiến hành gần đây như các loài vi khuẩn *Bacillus* spp. (Suryadi *et al.*, 2013), *B. stratiphericus* và *B. safensis* (Võ Thị Phương Trang, 2013), *Serratia nematodiphila* và *B. aerophilus* (Nguyễn Đăng Ngọc Giàu, 2014). Sử dụng vi sinh vật đối kháng để làm thay đổi quần thể sinh vật bản địa và có nguy cơ những vi sinh vật đối kháng sẽ đột biến và thay đổi thành những sinh vật gây hại (Duffy *et al.*, 2003; Kado, 2009). Việc ứng dụng các hoạt kim loại nano được xem là một hướng đi mới trong những năm gần đây nhưng số lượng nghiên cứu về việc ứng dụng các hạt nano kim loại làm chất kiểm soát vi sinh vật gây hại trên cây trồng ở Việt Nam vẫn còn hạn chế (Trần Phước Thọ, 2021). Hiện nay, kích thích tính kháng bệnh trên cây lúa (gọi tắt là kích kháng) là phương pháp giúp cho cây lúa bị nhiễm bệnh có khả năng kháng được bệnh ở một mức độ nào đó sau khi được xử lý bằng tác nhân kích kháng và thân thiện với môi trường (Kloepper *et al.*, 1992) và là một phương pháp quản lý bệnh thân thiện với môi trường (Walters *et al.*, 2005 và 2007). Các tác nhân kích kháng không

tác động trực tiếp ảnh hưởng lên mầm bệnh mà chỉ tạo ra các tín hiệu giúp kích thích cơ chế tự vệ có sẵn trong thực vật như sự tăng tích lũy các hợp chất phenol, các phytoalexin và sự tăng hoạt tính các protein liên quan đến quá trình phát sinh bệnh (pathogenesis-related proteins) hoặc các enzyme (peroxidase (PO), catalase (CAT) polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) nhằm ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh (Vidhyasekaran *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998). Các tác nhân kích kháng giúp cây lúa chống lại bệnh bạc lá gồm hóa chất, vi sinh vật và dịch trích thực vật. Chúng khác nhau về liều lượng, cơ chế tác động, thời điểm và phương pháp xử lý, hiệu quả giảm bệnh và khả năng duy trì tính kháng. Sử dụng các tác nhân kích kháng có nguồn gốc tự nhiên như dịch trích thực vật là một biện pháp quản lý bệnh hiệu quả với nhiều lợi thế hơn so với những biện pháp khác như dễ phân hủy, không độc hại cho người và môi trường, dễ sử dụng và có thể tận dụng nguồn nguyên liệu tại chỗ nên ít tốn chi phí (Khoa *et al.*, 2011).

Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa (2020) đã công bố một công trình nghiên cứu cho thấy lúa được ngâm với dịch trích cỏ cứt heo (*Ageratum conyzoides*) ở nồng độ 1% và 2% có hiệu quả làm giảm chiều dài vết bệnh bạc lá lúa tương đương với sử dụng thuốc hóa học và hiệu quả kéo dài đến 21 ngày sau khi chủng bệnh. Hiệu quả kích kháng có thể cần được lặp lại để duy trì hiệu quả giảm bệnh nên đề tài được thực hiện nhằm khảo sát hiệu quả giảm bệnh của dịch trích cỏ cứt heo bằng biện pháp ngâm hạt kết hợp phun qua lá ở nồng

độ 1%, 2%, 3% và cơ chế kích kháng liên quan đến bốn enzyme là PO, PPO, PAL và CAT.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Khảo sát khả năng làm giảm bệnh của dịch trích cỏ cứt heo ở điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại. Thí nghiệm được thực hiện trên giống lúa Jasmine 85 nguyên chủng (Viện Lúa đồng bằng Sông Cửu Long). Lúa được loại hết hạt lép và xử lý 2 sôi + 3 lạnh trước khi ngâm với dịch trích cỏ cứt heo.

Thí nghiệm bao gồm 9 nghiệm thức được xử lý kích kháng ở các nồng độ dịch trích dùng để ngâm hạt và các nồng độ dịch trích dùng để phun qua lá. Nghiệm thức đối chứng âm không xử lý dịch trích. Nghiệm thức đối chứng dương sử dụng thuốc hóa học Starner 20WP đặc trị bệnh bạc lá. Trong điều kiện nhà lưới, phun phòng bệnh ở thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau chùng bệnh (NSCB) với lượng 7,5 mg Starner 20WP (1 mg/ml, hoạt tính oxolinic acid 20% của tập đoàn Sumitomo Chemical Co., Ltd, Osaka, Nhật Bản) trong 10 ml cho mỗi chậu. Đối với biện pháp phun qua lá, thời điểm phun là 7 và 14 ngày trước chùng bệnh (NTCB).

2.1.1. Chuẩn bị dịch trích cỏ cứt heo

Dịch trích cỏ cứt heo: lá cỏ cứt heo được thu ở khuôn viên Trường Đại học Cần Thơ phải là lá tươi, trưởng thành và hái vào lúc khoảng 7 - 8 giờ sáng. Sau đó nguyên liệu được rửa sạch, cân, giã nhuyễn với nước cất, lọc bằng vải the để

thu được phần dịch trích và pha loãng đến nồng độ tương ứng. Nồng độ dịch trích được sử dụng là 1%, 2%, 3% cho cả hai biện pháp là ngâm hạt và phun qua lá.

2.1.2. Chuẩn bị đất

Đất thí nghiệm được thu trong khuôn viên Ký túc xá khu B Trường Đại học Cần Thơ và được phơi khô, băm nhỏ, bón vôi (100 g vôi bột cho 10 kg đất). Cho khoảng 7 kg đất đã qua xử lý vào chậu (27 × 33 cm²), ngâm nước 4 ngày, làm tơi đất trước khi gieo.

2.1.3. Trồng lúa

Mỗi chậu gồm 3 cây được tưới nước hằng ngày. Phân bón cho thí nghiệm trồng lúa nhà lưới gồm phân đạm - lân - kali (N - P - K) được sử dụng theo công thức 120 N - 40 P - 60 K của Trung tâm Khuyến nông Cần Thơ. Bón lót một ngày trước khi gieo với lượng là 2,4 g P. Các lần bón thúc tiếp theo với liều lượng là 0,5 g N và 0,12 g K ở các thời điểm 10 ngày, 20 ngày, 30 ngày sau khi gieo.

2.1.4. Chuẩn bị mầm bệnh

Mầm bệnh là vi khuẩn *Xoo* của Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm. Vi khuẩn *Xoo* được nuôi tăng sinh trên môi trường Wakimoto cải tiến.

2.1.5. Chùng bệnh và ghi nhận chỉ tiêu

Lúa được chùng bệnh ở giai đoạn 45 ngày sau khi gieo bằng phương pháp cắt chóp lá (Kauffman *et al.*, 1973) có mầm huyền phù vi khuẩn *Xoo* mật số 10⁹ CFU/mL. Trước khi chùng bệnh, khử trùng kéo bằng cồn 70° và cắt tại vị trí cách chóp lá 2 - 3 cm của lá (Khoa *et al.*,

2017). Chỉ tiêu được ghi nhận bằng cách đo chiều dài vết bệnh tính từ vị trí cắt đến vết lan cuối cùng trên lá qua 3 thời điểm 7, 14 và 21 NSCB.

2.2. Khảo sát hoạt tính enzyme trong mô lá lúa

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 nghiệm thức với 3 lần lặp lại. Nghiệm thức 1 là ngâm hạt bằng nước, không chủng bệnh. Nghiệm thức 2 là ngâm hạt bằng nước, có chủng bệnh. Nghiệm thức 3 là ngâm và phun bằng dịch trích thực vật, không chủng bệnh. Nghiệm thức 4 là ngâm và phun bằng dịch trích thực vật có chủng bệnh.

Chuẩn bị đất, gieo hạt, chuẩn bị mầm bệnh và chủng bệnh được thực hiện tương tự thí nghiệm trước. Nồng độ dịch trích cỏ cắt heo được chọn từ thí nghiệm trên là ngâm 2% phun 1% (nồng độ thấp nhất nhưng cho hiệu quả giảm bệnh kéo dài đến 21 NSCB).

2.2.1. Chuẩn bị mẫu lá và ly trích enzyme

Khi lúa được trồng đến giai đoạn 45 ngày tuổi, sau đó chủng bệnh bạc lá lúa như mô tả ở phần chủng bệnh bạc lá lúa. Mẫu lá lúa ở các nghiệm thức được thu ở thời điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 7 NSCB (dùng kéo cắt ngang bẹ của lá thứ 3 từ trên xuống) mỗi nghiệm thức thu 3 lá, mỗi cây 1 lá, sau đó mẫu lá được cho ngay vào nitor lỏng và đưa về phòng thí nghiệm trữ ở nhiệt độ -70°C như trong. Sử dụng các mẫu lá này để ly trích enzyme thô.

Ly trích enzyme thô được thực hiện tuân tự theo các bước là cân 0,1 g mô lá lúa đã được trữ trong tủ -70°C , sau đó mẫu được cắt nhuyễn và cho vào tuýp 2 ml có

chứa bi sắt đã được thanh trùng, tiếp theo ngâm trong nitor lỏng 20 phút và được nghiền thành bột mịn bằng máy nghiền mẫu. Sau khi nghiền mẫu được đồng nhất trong 1,5 ml dung dịch đệm. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C . Sau khi ly tâm, phần dung dịch nổi trên mặt được chuyển sang tuýp mới và được sử dụng như nguồn dịch chiết enzyme thô. Dịch chiết enzyme được trữ ở -20°C , sử dụng trong khoảng 5 - 7 ngày.

2.2.2. Khảo sát hoạt tính enzyme peroxidase (PO)

Khảo sát hoạt tính của enzyme PO được thực hiện theo phương pháp của Hammerschmidt *et al.* (1982) và điều chỉnh theo Khoa *et al.* (2017). Mẫu khảo sát được đo giá trị quang phổ ở bước sóng 470 nm và ghi nhận mỗi 30 giây và ghi nhận đến 2 phút. Hoạt tính enzyme PO được thể hiện qua sự thay đổi giá trị quang phổ (OD 470nm/phút/g mô lá). Mẫu đối chứng (blank) gồm 1,6 ml H_2O_2 0,05 M; 0,15 ml guiacol 0,15 M và 0,15 ml đệm sodium phosphate 0,1M (pH 6.5). Mẫu khảo sát hoạt tính enzyme PO được thực hiện phản ứng trong cuvette với 1,6 ml H_2O_2 0,05 M; 0,15 ml guiacol 0,15 M và 0,15 ml dịch trích enzyme.

2.2.3. Khảo sát hoạt tính enzyme catalase (CAT)

Khảo sát hoạt tính của enzyme CAT được thực hiện theo phương pháp của Beers and Sizer (1951) và điều chỉnh theo Khoa *et al.* (2017). Các mẫu được đo giá trị quang phổ ở bước sóng 240 nm và được ghi nhận mỗi 30 giây và ghi nhận đến 2 phút. Hoạt tính enzyme catalase

được thể hiện qua sự thay đổi giá trị quang phổ (OD 240 nm/phút/g mô lá). Mẫu đối chứng (blank) gồm 1,75 ml H₂O₂ 0,1 M và 0,15 ml đệm potassium phosphate 0,1 M (pH 7,0). Mẫu khảo sát hoạt tính enzyme CAT được thực hiện phản ứng trong cuvette với 1,75 ml H₂O₂ 0,1 M và 0,15 ml dịch trích enzyme.

2.2.4. Khảo sát hoạt tính enzyme polyphenol oxidase (PPO)

Khảo sát hoạt tính của enzyme PPO được thực hiện thông qua sự gia tăng nồng độ sản phẩm benzoquinone do phản ứng chuyển hóa catechol dưới sự xúc tác enzyme polyphenol oxidase theo phương pháp của Mayer *et al.* (1966), tham khảo của Nisha *et al.* (2012) và điều chỉnh theo Khoa *et al.* (2017). Mẫu khảo sát được đo ở bước sóng 490 nm và giá trị quang phổ có chiều hướng tăng dần theo thời gian phản ứng. Hoạt tính enzyme được thể hiện qua sự thay đổi giá trị quang phổ (OD 490 nm/phút/g mô lá). Giá trị quang phổ được ghi nhận mỗi 30 giây và ghi nhận đến 2 phút. Mẫu đối chứng (blank) gồm 1,75 ml catechol 0,1 M và 0,15 ml đệm potassium phosphate 0,1 M (pH 6,5). Mẫu khảo sát hoạt tính enzyme PPO được thực hiện phản ứng trong cuvette với 1,75 ml catechol 0,1 M và 0,15 ml dịch trích enzyme.

2.2.5. Khảo sát hoạt tính enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL)

Khảo sát hoạt tính của enzyme PAL được thực hiện thông qua sự gia tăng nồng độ sản phẩm *trans*-cinnamate do phản ứng chuyển hóa *L*-phenylalanine dưới sự xúc tác của enzyme phenylalanine ammonia lyase. Mẫu khảo sát được đo ở bước sóng

290 nm và giá trị quang phổ có chiều hướng tăng dần theo thời gian phản ứng. Giá trị quang phổ được ghi nhận sau khi phản ứng thực hiện được 40 phút ở 35°C và phản ứng được dừng lại bằng 0,2 ml HCl 5 N. Hoạt tính enzyme được thể hiện qua sự thay đổi giá trị quang phổ (OD 290 nm/phút/g mô lá) và được lấy trung bình của 3 lần lặp lại (Dickerson *et al.*, 1984). Mẫu đối chứng (blank) gồm 0,7 ml đệm sodium borate 0,1 M (pH 8,7); 1 ml *L*-phenylalanine 1 M và 0,15 ml nước cất thanh trùng. Mẫu khảo sát hoạt tính enzyme PAL được thực hiện trong tuýp với 0,5 ml đệm sodium borate 0,1 M (pH 8,7), 1 ml *L*-phenylalanine 1 M, 0,15 ml nước cất thanh trùng và 0,2 ml dịch trích enzyme.

2.3. Phân tích số liệu

Số liệu chiều dài vết bệnh bạc lá được phân tích phương sai và so sánh trung bình bằng phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5% theo từng chỉ tiêu khảo sát bằng phần mềm PC-SAS[®] 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Số liệu giá trị hấp thụ OD của thí nghiệm khảo sát enzyme được tính giá trị trung bình của 3 lần lặp lại và tính sai số chuẩn bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

III. KẾT QUẢ

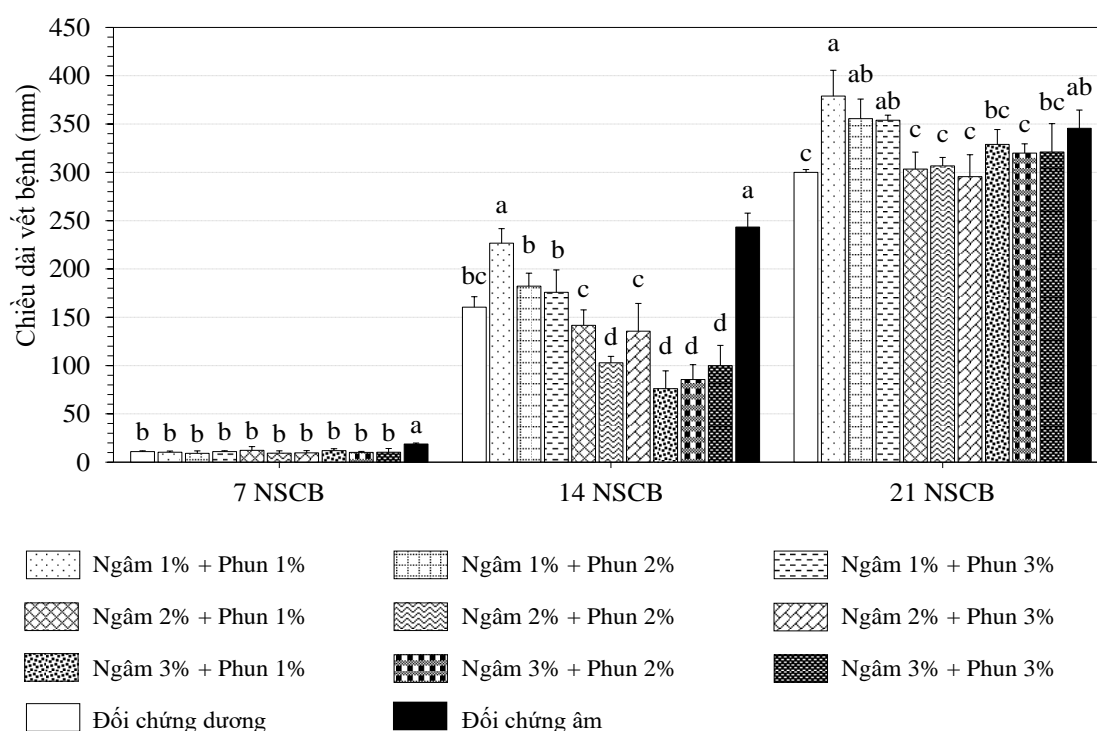
3.1. Khả năng làm giảm bệnh bạc lá lúa của dịch trích cỏ cứt heo trong điều kiện nhà lưới

Ở thời điểm 7 NSCB, chiều dài vết bệnh bạc lá của tất cả các nghiệm thức được xử lý với dịch trích cỏ cứt heo đều

có hiệu quả tương đương với nghiệm thức đối chứng dương và có sự khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng âm.

Ở thời điểm 14 NSCB, tất cả các nghiệm thức được xử lý dịch trích đều có hiệu quả tương đương nghiệm thức đối chứng dương trở lên và khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng âm ngoại trừ nghiệm thức ngâm 1% phun 1% mất hiệu quả giảm bệnh.

Ở thời điểm 21 NSCB, ba nghiệm thức hạt được ngâm với dịch trích 1% đã mất đi hiệu quả giảm bệnh. Ở tất cả các nghiệm thức còn lại, đều có sự khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng âm và khác biệt không ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng dương trừ nghiệm thức ngâm 3% phun 1% và ngâm 3% phun 3% có chiều dài vết bệnh ngắn hơn đối chứng âm nhưng khác biệt không ý nghĩa.



Hình 1. Trung bình chiều dài vết bệnh bạc lá lúa (mm) khi được xử lý ngâm hạt kết hợp phun qua lá bằng dịch trích cỏ cắt heo trong nhà lưới (NSCB: ngày sau chủng bệnh. Các số trung bình trong cùng thời điểm theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% bằng phép thử Duncan)

Tóm lại, các nghiệm thức ngâm 2% kết hợp ba nồng độ phun 1%, 2%, 3%; ngâm 3% phun 2% đều có hiệu quả giảm bệnh và duy trì đến 21 ngày. Nhưng với tiêu chí tiết kiệm nguyên liệu và hiệu quả giảm bệnh ổn định thì nồng độ được chọn là ngâm 2% kết hợp phun 1% để thực hiện

thí nghiệm khảo sát cơ chế kích kháng bệnh bạc lá lúa của dịch trích.

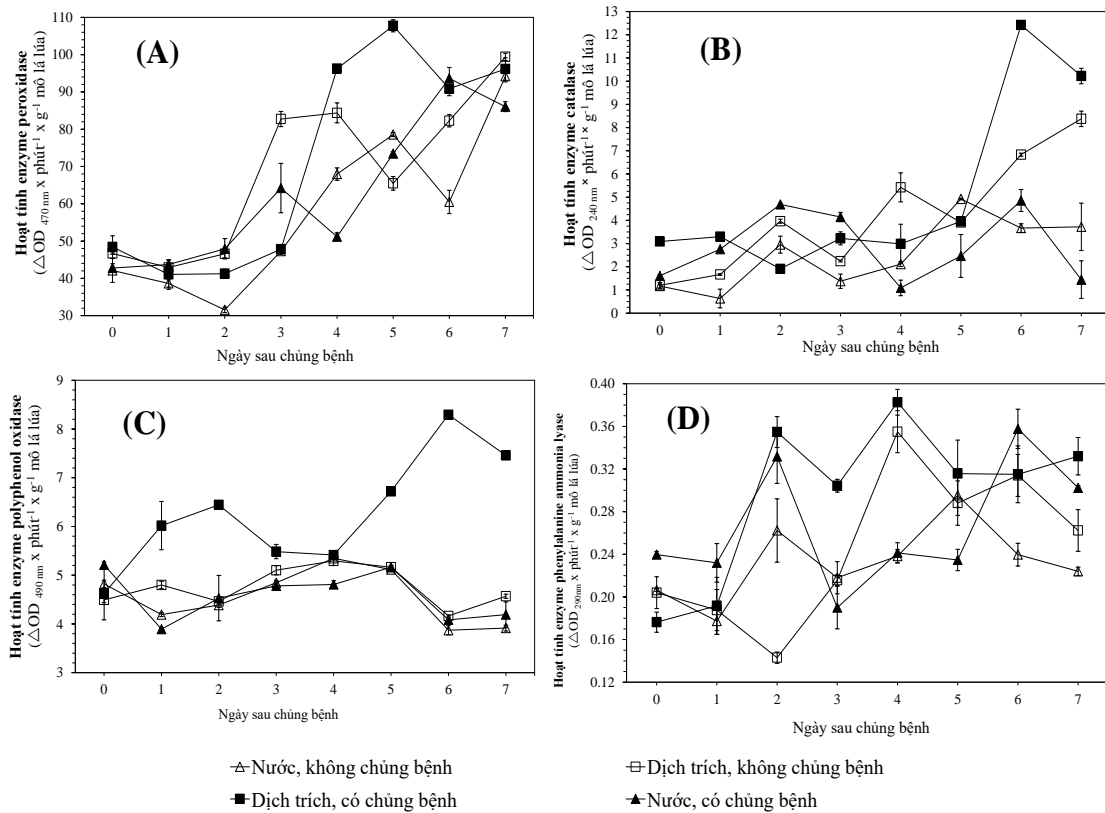
3.2. Cơ chế kích thích tính kháng bệnh bạc lá lúa của dịch trích cỏ cắt heo

Sự xâm nhập của mầm bệnh (nước, chủng bệnh) dẫn đến sự gia tăng hoạt

động của các enzyme PO, CAT (từ ngày 1 NSCB) và PPO, PAL (từ ngày 2 NSCB) so với nghiệm thức nước, không chủng bệnh (hình 3A, B, C và D). Hoạt tính enzyme đạt mức cao nhất ở 6 NSCB đối với enzyme PO, CAT và PAL và đạt cao nhất ở 5 NSCB đối với enzyme PPO.

Khi lúa được xử lý với dịch trích (dịch, không chủng bệnh), hoạt tính của

PO cao đáng kể so với nghiệm thức nước, không chủng trong khi hoạt động của PPO không cho thấy có sự thay đổi đáng kể nào cho đến ngày 7 DAI. Hoạt động của CAT tương đương với nghiệm thức nước, không chủng đến ngày 4 DAI thì có sự tăng trưởng và PAL thì tương đương nghiệm thức nước, không chủng.



Hình 2. Hoạt tính enzyme peroxidase (A), catalase (B), polyphenol oxidase (C) và phenylalanine ammonia lyase (D) trong mô lá lúa

Lúa được xử lý với dịch trích và chủng bệnh (dịch trích, chủng bệnh) cho thấy hoạt tính cao hơn hẳn ở cả bốn enzyme so với nghiệm thức dịch trích, không chủng bệnh. Hoạt tính của PO đạt cao nhất ở thời điểm 5 NSCB và cao gấp 1,7 lần so với nghiệm thức dịch trích, không chủng bệnh. CAT cũng cho thấy mô hình tương tự khi đạt

cao nhất ở thời điểm 6 NSCB và cao gấp 1,9 lần. Hoạt động của PPO bắt đầu tăng lên ở thời điểm 1 NSCB, đạt cao nhất ở 6 NSCB và luôn duy trì ở mức cao nhất trong 4 nghiệm thức được khảo sát. Hoạt động của PAL cũng tương tự PPO tăng ở thời điểm 1 NSCB nhưng từ 4 NSCB thì giảm dần đến 6 NSCB.

Từ dữ liệu của thí nghiệm enzyme cho thấy cơ chế tự bảo vệ của cây thông qua enzyme được kích hoạt từ 2 - 4 NSCB, kết quả trên phù hợp với những nghiên cứu trước đây về sự xâm nhiễm và phát triển của *Xoo* trong lá lúa. Vi khuẩn *Xoo* bắt đầu nhân lên ở 2 NSCB và gia tăng đều đặn đến 4 NSCB. Khi đủ số lượng cần thiết, vi khuẩn bắt đầu xâm nhập vào hệ thống mạch cây và tiếp tục nhân lên cho đến 14 NSCB. Do đó, tăng hoạt động của các enzyme liên quan đến cơ chế tự vệ của cây giúp làm giảm mật độ *Xoo* trong quá trình xâm nhiễm và nhân lên góp phần làm giảm bệnh bạc lá ở cây lúa.

Trong số bốn enzyme được thử nghiệm, enzyme PO cho thấy sự thay đổi rõ ràng nhất. Enzyme PO đóng nhiều vai trò trong các quá trình sinh lý ở thực vật bao gồm cấu tạo vách tế bào bao gồm lignin, suberin và các chất khác polysaccharit và glycoprotein. Từ dữ liệu của thí nghiệm enzyme PO cho thấy enzyme hoạt động tích cực trong quá trình kháng lại bệnh bạc lá lúa ở giai đoạn sớm (2 NSCB). Đặc biệt khi kết hợp việc xử lý với dịch trích và có mầm bệnh thì hoạt động của enzyme PO tăng mạnh so với chỉ xử lý dịch trích hoặc chỉ có mầm bệnh.

Với việc kết hợp xử lý dịch trích và có mầm bệnh, các enzyme khác bao gồm PAL và PPO cũng cho thấy hoạt tính ở mức độ cao hơn so với nghiệm thức không được xử lý dịch trích và không có mầm bệnh (hình 2C và 2D). PAL là một enzyme quan trọng trong quá trình tổng hợp phenylpropanoid, nó xúc tác chuyển đổi L-phenylalanine thành axit trans-cinnamic, phản ứng đầu tiên trong quá trình sinh tổng hợp các hợp chất phenolic

(chất chuyển hóa thứ cấp) bao gồm flavonoid và isoflavonoid (Garcion *et al.*, 2014). Các hợp chất này có chức năng quan trọng trong bảo vệ thực vật chống lại nhiều loại mầm bệnh. Sự gia tăng của PAL có thể ngăn chặn sự xâm nhiễm của *Xoo* vào hệ thống mạch cây vì enzyme này tăng cường quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp. PPO là một enzyme có hai chức năng là hydroxyl hóa và oxy hóa các hợp chất phenolic thành các ortho-quinone có hoạt tính cao, có tác dụng kháng khuẩn. Sự gia tăng hoạt động của enzyme này cũng đóng vai trò quan trọng trong việc làm giảm bệnh (Constabel and Barbehenn, 2008). Trong nghiên cứu này, PAL và PPO có cùng xu hướng hoạt động (tăng ở 2 NSCB) cho thấy các enzyme phối hợp và tác động hỗ trợ lẫn nhau. Tóm lại, đó là sự phối hợp của các enzyme phòng vệ PAL, PPO và PO trong kích kháng giúp bảo vệ cây lúa và giảm bệnh bạc lá lúa, đặc biệt là khi lúa được xử lý dịch trích sẽ đạt hiệu quả cao hơn so với không xử lý dịch trích.

Ngoài các enzyme liên quan đến cơ chế phòng vệ của cây, enzyme oxy hóa như CAT được khảo sát nghiên cứu qua kiểm tra sự thay đổi nồng độ của H_2O_2 vì hoạt động của enzyme này được cho là có mối tương quan với nồng độ H_2O_2 trong mô thực vật. H_2O_2 được chỉ ra rằng là có hại đối với các mầm bệnh như *Xoo* (Niño-Liu *et al.*, 2006). Enzyme này sẽ giết chết các tế bào thực vật xung quanh vị trí bị *Xoo* xâm nhiễm, dẫn đến ức chế sự lan rộng của vết bệnh.

Trong nghiên cứu này, hoạt động của CAT ở nghiệm thức xử lý dịch trích và có mầm bệnh được thấy là có xu hướng tăng

từ 1 đến 7 NSCB và cao hơn so với nghiệm thức không xử lý dịch trích và không có mầm bệnh. Khi không có mầm bệnh, hoạt động của CAT của nghiệm thức xử lý dịch trích hoạt động cao hơn nghiệm thức không xử lý, có thể thấy dịch trích xúc có tác dụng xúc tác sản sinh CAT. Khi có mầm bệnh thì cũng có mô hình tương tự nhưng có sự tăng mạnh trong hoạt động của CAT từ ngày 5 NSCB của nghiệm thức có xử lý dịch trích so với nghiệm thức không được xử lý dịch trích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Beers, R.F. and Sizer, J.R., 1951. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxyde by catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 195(1): 133 - 140.
2. Chithrashree, U.S., Udayashankar, A.C., ChandraNayaka, S., Reddy, M.S. and Srinivas, C., 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 59: 114 - 122.
3. Constabel, C.P. and Barbehenn, R., 2008. Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants. *Induced Plant Resistance to Herbivorous*. S. Netherlands, Dordrecht.
4. Cuong, C.N., Nguyen, T.Q., Kanaori, K., Binh, T.D., Dao, X.H., Vang, L.V. and Kamei, K. 2021. Antifungal Activities of *Ageratum conyzoides* L. Extract against Rice Pathogens *Pyricularia oryzae* Cavara and *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agriculture*, 11(11), 1169.
5. Dinh, H.D., Oanh, N.K., Toan, N.D., Du, P.V. and Loan, L.C., 2008. Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolated from the rice ecosystem in Cuu long river delta. *Omorice* 16: 34 - 40.
6. Duffy, B., Schouten, A. and Raaijmakers, J.M., 2003. Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 501 - 38.
7. Garcion, C., Lamotte, O., Cacas, J. - L. and Métraux, J. - P., 2014. Mechanisms of Defence to Pathogens: Biochemistry and Physiology, in: *Induced Resistance for Plant Defense*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 106 - 136. <https://doi.org/10.1002/9781118371848.ch6>
8. Govindappa, M., Umesha, S. and Lokesh, S., 2011. Adathoda vasica leaf extract induces resistance in rice against bacterial leaf blight disease *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Internationnal Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 3(1): 6 - 14.
9. Hammerschmidt, R., Nucldes, E.M. and Kuć, J., 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20(1): 73 - 82.
10. Handelsman, J. and Stabb, E.V., 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*. 8: 1855 - 1869.
11. Hop, D.V, Phuong Hoa, P.T., Quang, N.D., Ton, P.H., Ha, T.H., Van Hung, N., Van, N.T., Van Hai, T., Kim Quy, N.T., Anh Dao, N.T. and Thi Thom, V., 2014. Biological control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial blight disease by *Streptomyces toxytricini* VN08-A-12, isolated from soil and leaf-litter samples in Vietnam. *Biocontrol science*. 19(3):103 - 111.
12. Kado, C.I., 2009. Horizontal gene transfers: sustaining pathogenicity and optimizing host-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 10: 143 - 50.
13. Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R. and Samiyappan, R., 2004. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65: 91 - 100.
14. Karganilla, A.D., Paris - Natural, M. and Ou, S.H., 1973. A comparative study of culture media for *Xanthomonas oryzae*. *The Philipp. Agric.* 57: 141 - 152.

15. Khan, J.A., Siddiq, R., Arshad, H.M.A., Anwar, H.S., Saleem, K. and Jamil, F.F., 2012. Chemical control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pakistan Journal of Phytopathology*. 24:97 - 100.
16. Khoa N.Đ, Xa, T.V. and Hào, L.T., 2017. Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *Kalanchoe pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100:57 - 66.
17. Khoa, N.D., 2010. Control of sheath blight and other rice diseases by induced resistance using an extract of the plant *Chromolaena odorata*. PhD thesis. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark. 100 pages.
18. Khoa, N.D, Tuan, T.Q., Giau, N.D.N., 2016. Effects of *Serratia nematodiphila* CT - 78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*: 103: 1 - 10.
19. Khoa, N.D., 2005. Effect of single resistance genes and their pyramid on the diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* population under field conditions as revealed by insertion sequence-polymerase chain reaction (IS-PCR). MSc Thesis. University of the Philippines Los Baños, 105 pages.
20. Klopper, J.W, Tuzun, S. and Kuć, J.A., 1992. Propose definitions relates to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*. 2: 349 - 351.
21. Lingaiah, S. and Umesha, S., 2013. *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Canadian Journal of Plant Protection*. 1:147 - 153.
22. Mew, T.W., Alvarez, A.M., Leach, J.E. and Swings, J., 1993. Focus on bacterial blight of rice. *Plant disease*. 77:5 - 12.
23. Mohan Babu, R., Sajeena, A., Vijaya Samundeeswari, A., Sreedhar, A., Vidhyasekeran, P. and Reddy, M.S., 2003a. Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar-S-methyl. *Annals of Applied Biology*. 143:333 - 340.
24. Nguyễn Đắc Khoa, 2018. Bệnh bạc lá lúa. Sách Bệnh hại cây trồng Việt Nam. Chủ biên: Vũ Triệu Mân, Nguyễn Văn Tuất, Bùi Cách Tuyến và Phạm Văn Kim. Nxb. Học viện Nông nghiệp, Việt Nam. 643 trang (112 - 119).
25. Nguyễn Thị Thu Hương, Lâm Tấn Hào và Nguyễn Đắc Khoa, 2018. Hiệu quả giảm bệnh và cơ chế kích kháng liên quan đến enzyme phenylalanine ammonia-lyase và polyphenol oxidase đối với bệnh bạc lá lúa khi phun qua lá với dịch trích lá sống đời. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 54: 13 - 21.
26. Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C. and Bogdanove, A.J., 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogen of a model crop. *Molecular plant pathology*. 7(5):303 - 324.
27. Nisha, S., Revathi, K., Chandrasekaran, R., Kirubakaran, S.A., Sathish-Narayanan, S., Stout, M.J. and Senthil-Nathan, S., 2012. Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 80:1 - 9.
28. Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P. and Watkins, C.B., 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology*. 115:137 - 149.
29. Shetty, N.P., Jørgensen, H.J.L., Jensen, J.D., Collinge, D.B. and Shekar Shetty, H., 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 121:267 - 280.
30. Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H., Collinge, D.B. and Jørgensen, H.J.L., 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist*. 174:637 - 647.

31. Suryadi, Y., Susilowati D.N., Priyatno, T.P., Samudra, I.M., Kadir, T.S. and Mubarik, N.R., 2013. Prospect of Using Bacterial Bio - formulation to Suppress Bacterial Leaf Blight of Rice: A Case Study in Cianjur, West Java. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 32:83 - 90.
32. Swings, J., van Denmooter, M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T.W. and Kersters, K., 1990. Reclassification of the Causal Agents of Bacterial Blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and Bacterial Leaf Streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of Rice as Pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp.nov., nom.rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40:309 - 311.
33. Trần Thị Thu Thủy và Hans Jorgen Lyng Jorgensen, 2016. Quản lý bệnh hại lúa bằng dịch trích thực vật. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*: 111 - 119.
34. Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa, 2020. Tuyển chọn dịch trích thực vật có khả năng giúp giảm bệnh bạc lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 19 năm 2020. Tr. 384 - 395.
35. Trương Văn Xạ và Nguyễn Đắc Khoa, 2021. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) của các loài dịch trích thực vật bản địa tại đồng bằng Sông Cửu Long. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam năm 2021. Tr. 407 - 418.
36. Trương Văn Xạ, 2015. Khảo sát khả năng và cơ chế kích thích tính kháng bệnh cháy bìa lá lúa của dịch trích thực vật. Luận văn tốt nghiệp cao học. Trường Đại học Cần Thơ.
37. van Loon, L.C., Bakker, P.A. and Peitersen, C.M., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36:453 - 483.

ABSTRACT

Disease-reducing effects involved induced resistance against rice bacterial leaf blight of aqueous leaf extracts of *Ageratum conyzoides* using combinations of seed soaking and foliar spraying

*This study aims at testing for the disease-reducing effects under greenhouse conditions of aqueous *Ageratum conyzoides* leaf extracts against rice bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) using combinations of seed soaking and foliar spraying then investigating mechanisms behind the disease reduction, focusing on induced resistance. Three extract concentrations [1%, 2% và 3% (w/v)] and two spraying timepoints [7 and 14 days before pathogen inoculation (DBI)] were tested. Effects of the combinations of seed soaking 2% + foliar spraying 3% 7 DBI and seed soaking 2% + foliar spraying 1% 7 DBI were significantly different from that of the untreated control while the former provided the strongest protection at all disease assessment timepoints (7, 14 and 21 days after pathogen inoculation). The disease reduction involves induced resistance as activities of the four defense - related enzymes against rice bacterial leaf blight, i.e., peroxidase, catalase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase significantly increased after extract applications, particularly with the presence of Xoo.*

Keywords: *ageratum conyzoides, bacterial leaf blight, induced resistance, rice, Xanthomonas oryzae pv. oryzae*

KHẢ NĂNG GIÚP GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA HỖN HỢP HAI VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus safensis* AG-131 VÀ *Bacillus stratosphericus* AG-62

Thái Quốc Khánh¹, Nguyễn Đắc Khoa^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm,
Trường Đại học Cần Thơ

* E-mail liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Vi khuẩn đối kháng *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 khi chủng vào đất (10^7 CFU/mL) có khả năng giúp giảm bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây ra trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng. Hai vi khuẩn này không đối kháng nhau khi nuôi trên cùng môi trường nên được phối trộn với ba tỉ lệ 1:1, 1:2 và 2:1 để khảo sát khả năng giúp giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Ba hỗn hợp vi khuẩn đều có hiệu quả tương đương với thuốc hóa học ở thời điểm 7 và 14 ngày sau chủng bệnh (NSCB), riêng hỗn hợp với tỉ lệ 2:1 duy trì hiệu quả đến 21 NSCB. Hiệu quả của các hỗn hợp hai vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với sử dụng mỗi vi khuẩn đơn lẻ. Vì vậy, thay đổi tỉ lệ phối trộn hoặc mật số mỗi vi khuẩn nên được khảo sát thêm để nâng cao hiệu quả giúp giảm bệnh của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn này, làm tiền đề ứng dụng vào sản xuất, bảo vệ môi trường và sức khỏe cộng đồng.

Từ khóa: bạc lá, *Bacillus safensis*, *Bacillus stratosphericus*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra là một trong những bệnh hại nghiêm trọng nhất, làm giảm khả năng quang hợp, lép hạt, giảm năng suất và chất lượng hạt lúa đến 50% (Khush *et al.*, 1989). Phòng trị bệnh bạc lá bằng vi sinh vật đối kháng là một giải pháp thay thế thân thiện với

môi trường và tiết kiệm chi phí so với sử dụng thuốc hóa học. Vi khuẩn đối kháng hiện diện thường xuyên trong đất sẽ ức chế khả năng phát triển của mầm bệnh, làm giảm mật số vi khuẩn gây bệnh, mang lại hiệu quả tác động lâu dài (Agrios *et al.*, 1988). Việc kết hợp các loài vi sinh vật có lợi để sử dụng có thể giúp cây trồng sinh trưởng tốt hơn, tăng năng suất và chất lượng nông sản (Pupakdeepan *et al.*, 2009; Katsenios *et al.*, 2021; Huỳnh Yến Nhi và

Người phân biên: TS. Nguyễn Đức Độ

ctv., 2022). Các loài vi khuẩn đối kháng tiết chất kháng sinh hoặc chất ức chế sự phát triển của mầm bệnh và khi được kết hợp, tác động chống vi khuẩn gây hại sẽ tăng cường đáng kể. *Bacillus safensis* AG-131, *Bacillus stratosphericus* AG-62 là hai chủng vi khuẩn được phân lập tại đất trồng lúa thuộc tỉnh An Giang có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *Xoo* và cho hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Hoàng Thông, 2014; Tô Anh Khoa, 2014). Kết quả nghiên cứu trong điều kiện nhà lưới của Thái Trần Anh Thư và ctv. (2022) cho thấy ba tỉ lệ phối trộn hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 gồm 1:1, 1:2 và 2:1 (mỗi hỗn hợp 40 mL) có hiệu quả giảm bệnh tương đương với thuốc hóa học nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với sử dụng từng chủng vi khuẩn riêng lẻ. Nghiên cứu này tiếp tục khảo sát khả năng giúp giảm bệnh bạc lá của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 với ba tỉ lệ 1:1, 1:2 và 2:1 tính theo thể tích, mỗi đơn vị thể tích là 40 mL.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Xoo* và hai chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 được cung cấp từ Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

Giống lúa sử dụng là Jasmin 85.

2.2. Khảo sát sự đối kháng giữa hai chủng *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 trên đĩa thạch

Sự đối kháng giữa hai chủng AG-131 và AG-62 được xác định bằng phương

pháp đồng nuôi cấy trên đĩa thạch, tương tự nghiên cứu Thái Trần Anh Thư và ctv. (2022).

2.3. Khảo sát sự đối kháng giữa hai chủng *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 trong môi trường lỏng

Khảo sát sự đối kháng trong môi trường lỏng được thực hiện bằng cách nuôi tăng sinh và tính sự gia tăng mật số sau 24 giờ bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Chuẩn bị ba bình tam giác chứa 100 mL môi trường NB, hai bình môi trường đầu tiên, mỗi bình cho vào một vòng đầy que cấy từng chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62 để nuôi tăng sinh riêng lẻ và bình môi trường còn lại cho cả hai chủng vào nuôi cùng lúc. Vi khuẩn được nuôi trên máy lắc ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 24 giờ. Sau đó tính số lượng vi khuẩn có trong bình bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

2.4. Khảo sát hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức, được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, ba lần lặp lại, mỗi chậu là một lần lặp lại. Trong đó ba nghiệm thức phối trộn được xử lý với hỗn hợp huyền phù hai chủng AG-131 và AG-62 ở mật số 10^7 CFU/mL với tỷ lệ 1:1, 1:2 và 2:1 theo thể tích, mỗi đơn vị thể tích là 40 mL; hai nghiệm thức xử lý với từng chủng vi khuẩn riêng lẻ; nghiệm thức đối chứng âm được xử lý bằng nước cất và nghiệm thức đối chứng dương được xử lý bằng thuốc hóa học Starner 20 WP.

Xử lý đất: đất được băm nhỏ, phơi khô, bón vôi để xử lý phèn và diệt mầm

bệnh, vi khuẩn có trong đất. Sau đó, đất được vào chậu (đường kính 40 cm) đến khoảng 30 cm chiều cao của chậu, ngâm nước trong 4 ngày. Làm nhuyễn đất trong chậu, tháo nước và làm ráo mặt trước khi gieo.

Xử lý hạt giống: giống lúa Jasmine 85 được ngâm với nước ấm theo tỷ lệ 3 sôi 2 lạnh trong 20 phút để loại bỏ các hạt lép lửng và hạn chế mầm bệnh. Sau đó, tiếp tục ngâm hạt với nước lạnh trong 24 giờ và ủ 48 giờ để hạt nảy mầm trước khi gieo.

Chăm sóc lúa: nước trong chậu luôn giữ ngập gốc, đồng thời bón phân với 4 đợt:

- Đợt 1 (trước khi gieo): 100% P_2O_5 (2,4 g/chậu).

- Đợt 2 (10 ngày sau khi gieo): 1/5 N (0,5 g/chậu) + 1/4 K_2O (0,12 g/chậu).

- Đợt 3 (18 ngày sau khi gieo): 2/5 N (1 g/chậu) + 1/4 K_2O (0,12 g/chậu).

- Đợt 4 (40 ngày sau khi gieo): 1/5 N (0,5 g/chậu) + 1/4 K_2O (0,12 g/chậu).

Chủng huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất: huyền phù vi khuẩn được chủng vào đất 24 giờ trước khi gieo với mật số 10^7 CFU/mL. Vi khuẩn đối kháng được nuôi trong bình chứa môi trường NB, ủ ở $28 \pm 2^\circ C$ trong 24 giờ. Huyền phù vi khuẩn được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 600 nm và pha lại mật số 10^7 CFU/mL thông qua phương trình đường chuẩn hai chủng AG-131 và AG-62 lần lượt như sau (Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên, 2018):

- $y = 2 \times 10^{-9}x + 0,011$

- và $y = 8 \times 10^{-9}x - 0,0507$

Với x là mật số vi khuẩn đối kháng (CFU/mL); y là giá trị OD đo được.

Phương pháp chủng bệnh: khi lúa đạt 45 ngày sau khi gieo, tiến hành chủng bệnh bằng cách nhúng kéo vào huyền phù vi khuẩn X00 ở mật số 10^9 CFU/mL (Võ Thị Phương Trang, 2013) cắt 5 chóp lá trưởng thành và đo chiều dài vết bệnh của 3 lá/chậu biểu hiện rõ bệnh vào thời điểm 7, 14 và 21 NSCB.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới được tính trung bình bằng phần mềm Microsoft Excel 2013, phân tích phương sai một chiều (Oneway ANOVA) bằng phần mềm SPSS 20, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% để so sánh trung bình các nghiệm thức.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đối kháng giữa hai chủng AG-131 và AG-62 trên đĩa thạch

Kết quả cho thấy không xuất hiện vòng vô khuẩn giữa hai chủng vi khuẩn AG-131 và AG-62. Qua đó có thể thấy hai chủng vi khuẩn này có thể phát triển cùng lúc trên đĩa thạch. Hai chủng AG-131 và AG-62 tiếp tục được khảo sát khả năng đối kháng trong môi trường lỏng để kiểm tra mật số vi khuẩn có bị ức chế khi nuôi tăng sinh cùng lúc hay không.

3.2. Đối kháng giữa hai chủng AG-131 và AG-62 trong môi trường lỏng

Mật số vi khuẩn ở bình nuôi tăng sinh cùng lúc hai chủng vi khuẩn so với tổng mật số của hai bình nuôi từng chủng đã thấp hơn 10^8 CFU/mL (bảng 1). Tuy nhiên, không đủ cơ sở để khẳng định rằng hai chủng AG-131 và AG-62 đối kháng nhau, do khi thực hiện đồng nuôi cấy trên

đĩa thạch, hai chủng AG-131 và AG-62 phát triển bình thường và không có hiện tượng tạo vòng vô khuẩn. Mật số giảm khi nuôi tăng sinh cùng lúc có thể là do sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng và sự khác biệt về điều kiện môi trường thuận lợi của từng chủng. Theo Morris *et al.* (2013) sự tồn tại của một loài vi khuẩn sẽ làm thay đổi môi trường xung quanh. Thay đổi các yếu tố như pH và tạo ra các chất biến dưỡng tạo

điều kiện thuận lợi nhất cho sự tăng trưởng mật số của vi khuẩn đó. Giữa hai chủng AG-131 và AG-62 có sự khác biệt về khoảng giá trị pH, mặc khác sự khác biệt về tốc độ tăng trưởng, khả năng tiêu thụ dinh dưỡng, chất biến dưỡng sinh ra khác nhau và việc chia sẻ nguồn tài nguyên sống làm sự tăng mật số giữa hai chủng giảm đi.

Bảng 1. Mật số vi khuẩn sau 24 giờ nuôi trong môi trường NB

Chủng vi khuẩn	Mật số (CFU/mL)
<i>B. safensis</i> AG-131	$54,18 \times 10^8$
<i>B. stratosphericus</i> AG-62	$6,51 \times 10^8$
<i>B. safensis</i> AG-131 + <i>B. stratosphericus</i> AG-62	$59,65 \times 10^8$

Bên cạnh khả năng đối kháng trực tiếp với vi khuẩn *Xoo* thì dịch nuôi cấy của hai chủng vi khuẩn này tạo ra cũng cho hiệu quả đối kháng (Võ Thị Phương Trang, 2013) đồng thời hai chủng vi khuẩn này còn tăng cường hoạt động enzyme phòng vệ của cây (Lê Thanh Mẫn, 2019). Do đó hai chủng vi khuẩn đối kháng AG-131 và AG-62 vẫn được sử dụng kết hợp để khai thác tiềm năng giúp giảm bệnh bạc lá lúa.

3.3. Hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới

Chiều dài vết bệnh được thể hiện trong bảng 2. Nhìn chung, tất cả nghiệm thức được xử lý với huyền phù vi khuẩn đối kháng đều có chiều dài vết bệnh ngắn hơn so với đối chứng âm. Hỗn hợp vi khuẩn ở ba tỷ lệ phối trộn đều cho hiệu quả giảm bệnh tương đương với thuốc hóa học ở thời điểm 7 và 14 NSCB, riêng hỗn hợp với tỉ lệ 2:1 duy trì hiệu quả đến 21 NSCB. Tuy nhiên, hiệu quả khi sử dụng

hỗn hợp hai chủng vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với sử dụng từng chủng vi khuẩn riêng lẻ.

Điều đó cho thấy số lượng vi khuẩn hiện diện trong đất ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả giảm bệnh. Vi khuẩn đối kháng mang lại hiệu quả giảm bệnh cao khi hiện diện trong đất ở số lượng thích hợp, nếu thấp hoặc cao hơn ngưỡng thích hợp đều không mang lại hiệu quả. Theo Hibbing *et al.* (2012) khi mật số vi khuẩn quá cao, dinh dưỡng trong đất có thể không đủ để vi khuẩn đối kháng tiếp tục phát triển, sự cạnh tranh dinh dưỡng có thể diễn ra giữa các loài khác nhau, giữa các dòng trong cùng một loài hoặc giữa các cá thể trong cùng một dòng. Khi môi trường dinh dưỡng bị cạn kiệt và sự cạn kiệt dinh dưỡng kéo dài vi khuẩn sẽ hình thành bào tử để có thể tồn tại trong môi trường khắc nghiệt (Satomi *et al.*, 2006; Shivaji *et al.*, 2006).

Ở các nghiệm thức sử dụng từng chủng vi khuẩn riêng lẻ, mật số vi khuẩn được sử dụng là 10^7 CFU/mL cho hiệu quả giảm bệnh tương đương với thuốc hóa học đến 21 NSCB, kết quả này tương tự với các nghiên cứu trước đây (Võ Thị Phương Trang, 2013; Thái Trần Anh Thư và *ctv.*, 2022).

Trong nghiên cứu của Thái Trần Anh Thư và *ctv.* (2022) biện pháp sử dụng huyền phù vi khuẩn AG-131 và AG-62 phối trộn ở tỉ lệ 1:1; 1:2 và 2:1 mang lại hiệu quả giảm bệnh đến 21 NSCB tuy nhiên mật số vi khuẩn của hỗn hợp phối trộn này là 10^7 CFU/mL. Trong nghiên cứu này, do đã thay đổi thể tích nên mật số vi khuẩn đã tăng lên theo tỷ lệ phối trộn, cụ thể ở tỉ lệ 1:1 mật số vi khuẩn là 2×10^7 CFU/mL. Việc tăng mật số vi khuẩn đã làm hiệu quả giảm bệnh không duy trì đến thời điểm 21 NSCB ở tỉ lệ phối trộn 1:1 và 1:2 nhưng ở tỉ lệ 2:1 lại duy trì

hiệu quả này, điều này có thể được giải thích do chủng AG-131 có tốc độ tăng trưởng gấp 8 lần so với chủng AG-62 (bảng 1), cho nên khi phối trộn hai chủng này ở tỉ lệ 2:1, mật số vi khuẩn trong hỗn hợp phối trộn này là cao hơn so với khi phối trộn ở tỉ lệ còn lại. Do đó, theo cùng một thời gian số lượng vi khuẩn trong nghiệm thức này sẽ tăng nhanh nhất và sự cạnh tranh dinh dưỡng cũng sẽ xảy ra sớm hơn so với các nghiệm thức chủng vi khuẩn đối kháng còn lại. Việc cạnh tranh sẽ làm vi khuẩn chết đi hoặc hình thành bào tử và có thể khi gần đến thời điểm 21 NSCB mật số vi khuẩn đã giảm đi nhiều và lượng chất biến dưỡng do vi khuẩn sinh ra giảm đi ở mức phù hợp để duy trì hiệu quả giảm bệnh. Vì vậy, việc phối trộn vi khuẩn đối kháng nên được khảo sát thêm về tỉ lệ và mật số vi khuẩn để nâng cao hiệu quả giúp giảm bệnh của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn này.

Bảng 2. Chiều dài vết bệnh ở thời điểm 7, 14 và 21 NSCB

Nhóm nghiệm thức	Nghiệm thức	Chiều dài vết bệnh (mm)		
		7 NSCB	14 NSCB	21 NSCB
Riêng lẻ	AG-131	2,11	9,55	134,11 ^{ab}
	AG-62	2,56	6,44	133 ^{ab}
Phối trộn	AG-131 : AG-62 (1:1)	1,89	4,33	165 ^a
	AG-131 : AG-62 (1:2)	1,89	6,89	181,11 ^a
	AG-131 : AG-62 (2:1)	1,56	16,11	134,33 ^{ab}
Đối chứng	Nước cất	1,89	19	198,7 ^a
	Starter 20WP	1,22	16,89	34,89 ^b
	<i>F</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
	CV (%)	46,26	85,85	49,7

Ghi chú: trong cùng một cột, các trung bình được theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan.

*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. *ns*: khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

4. KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn *B. safensis* AG-131 và *B. stratosphericus* AG-62 không đối kháng nhau khi nuôi trên cùng môi trường. Ba hỗn hợp vi khuẩn (tỉ lệ 1:1, 1:2 và 2:1) đều có hiệu quả giảm bệnh bạc lá tương đương với thuốc hóa học ở thời điểm 7 và 14 NSCB, riêng hỗn hợp với tỉ lệ 2:1 duy trì hiệu quả đến 21 NSCB. Hiệu quả của các hỗn hợp hai vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với sử dụng từng chủng vi khuẩn đơn lẻ. Vì vậy, thay đổi tỉ lệ phối trộn hoặc mật số mỗi vi khuẩn nên được khảo sát thêm để nâng cao hiệu quả giúp giảm bệnh của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn này, làm tiền đề ứng dụng vào sản xuất, bảo vệ môi trường và sức khỏe cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G.N., 1988. Plant pathology, Third edition. Academic press. New York, 845 pages.
2. Hibbing, M.E., Fuqua C., Parsek, M.R. and Peterson, S.B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nature Reviews Microbiology. 8(1):15 - 25.
3. Huỳnh Yến Nhi, Nguyễn Quang Tiến và Nguyễn Đắc Khoa, 2022. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus pumilus* TG-71 và *Bacillus aerophilus* HG-33 trong điều kiện nhà lưới. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 21 ngày 22/7/2022 tại Trường Đại học Đông Á, Đà Nẵng, Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Việt Nam: 36 - 43.
4. Khush, G.S and Ogawa, T., 1989. Major gen for resistance to bacterial blight in rice. 177 - 192.
5. Katsenios, N., Andreou, V., Sparangis, P., Djordjevic, N., Giannoglou, M., Chanioti, S., Stergiou, P., Xanthou, M. Z., Kakabouki, I., Vlachakis, D., Djordjevic, S., Katsaros, G. and Efthimiadou, A., 2021. Evaluation of Plant Growth Promoting Bacteria Strains on Growth, Yield and Quality of Industrial Tomato. Microorganisms. 9(10):2099.
6. Lê Thanh Mẫn, 2019. Khảo sát cơ chế kích kháng thông qua hoạt tính các enzyme phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, peroxidase và catalase của vi khuẩn *Bacillus safensis* và *Bacillus stratosphericus* đối với bệnh cháy bìa lá lúa. Luận văn đại học. Trường Đại học Cần Thơ.
7. Morris, B.E.L., Henneberger, R., Huber, H. and Moissl - Eichinger, C., 2013. Microbial syntrophy: interaction for the common good. FEMS Microbiology Reviews. 37(3): 384 - 406.
8. Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên, 2018. So sánh hiệu quả giảm bệnh của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và *Serratia nematodiphila* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(9B):59 - 66.
9. Nguyễn Hoàng Thông, 2014. Khảo sát khả năng phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Bacillus safensis* trên ruộng lúa tại tỉnh An Giang và Tiền Giang. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Cần Thơ.
10. Pupakdeepan, W. and Prathuangwong, S., 2009. Mixtures of antagonistic strains to enhance control efficacy of bacterial leaf blight and growth promotion of rice. Plant 2009. Proceedings of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 17 - 20 March, Kasetsart University. Kasetsart University, Bangkok:601 - 610.
11. Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar J.V. and Bhargava P.M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air sample from high altitudes. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 56(7):1465 - 1473.
12. Satomi, M., Duc, M.T.L. and Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56:1735 - 1740.

13. Thái Trần Anh Thư, Nguyễn Thị Mỹ Á, Nguyễn Quang Tiến và Nguyễn Đắc Khoa, 2022. Hiệu quả giảm bệnh bạc lá lúa của hỗn hợp hai chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus safensis* AG-131 và *Bacillus stratosphericus* AG-62 trong điều kiện nhà lưới. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam lần thứ 21 ngày 22/7/2022 tại Trường Đại học Đông Á, Đà Nẵng, Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Việt Nam:36 - 43.
14. Tô Anh Khoa, 2014. Khảo sát khả năng phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Bacillus stratosphericus* trên ruộng lúa tại tỉnh An Giang và Tiền Giang. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Cần Thơ.
15. Võ Thị Phương Trang, 2013. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn đối kháng trong đất tỉnh An Giang. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ.

ABSTRACT

Disease-reducing effects against rice bacterial leaf blight of mixtures of the antagonistic *Bacillus safensis* AG-131 and *Bacillus stratosphericus* AG-62

The antagonistic Bacillus safensis AG-131 and Bacillus stratosphericus AG-62 applied as soil drenching (10^7 CFU/mL) could reduce rice bacterial leaf blight caused by Xanthomonas oryzae pv. oryzae under greenhouse and field conditions. No inhibition was observed in dual culture tests of the two bacteria. The disease - reducing effects of their mixtures using three different mixing ratios, i.e., 1:1, 1:2 and 2:1, were therefore tested under greenhouse conditions. Similar effects as that of the chemical control were shown by all mixtures at 7 and 14 days after inoculation (DAI) while the mixture of AG-131 and AG-62 using 2:1 ratio could maintain its effects until 21 DAI. Effects of the mixtures were however not significantly different from those of the applications of each bacterium. Further studies on mixing ratios and/or cell densities of the antagonistic bacteria should be done to improve the effects.

Keywords: *Bacillus safensis, Bacillus stratosphericus, bacterial leaf blight, Xanthomonas oryzae pv. oryzae.*

TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐỂ KÍCH THÍCH KHẢ NĂNG TẠO BÀO TỬ CỦA VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus safensis* AG-131 PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ LÚA

**Thái Trần Anh Thư¹, Bùi Khánh Vy¹,
Nguyễn Quang Tiến¹, Nguyễn Đắc Khoa^{1*}**

*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm,
Trường Đại học Cần Thơ*

* E-mail liên hệ: ndkhoa@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Vi khuẩn đối kháng Bacillus safensis AG-131 được phân lập từ đất ruộng tỉnh An Giang và có khả năng phòng trị bệnh bạc lá lúa. Sử dụng ma trận Plackett-Burman để sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình tạo bào tử của vi khuẩn AG-131 cho thấy glucose, peptone và ZnSO₄.7H₂O là 3 yếu tố chính. Giá trị của các yếu tố này được tối ưu hóa bằng cách kết hợp phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology, RSM) và phương án cấu trúc có tâm (Central Composite Designs, CCD). Kết quả giá trị tối ưu của glucose, peptone và ZnSO₄.7H₂O lần lượt là 13 g/L, 15 g/L và 1 g/L. Mật số bào tử đạt $9,78 \times 10^4$ CFU/mL khi áp dụng các giá trị này.

Từ khóa: Bacillus safensis, bạc lá, bào tử, lúa, ma trận Plackett-Burman, phương án cấu trúc có tâm, phương pháp đáp ứng bề mặt.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacillus safensis AG-131 được phân lập tại tỉnh An Giang, đánh giá có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây bệnh bạc lá lúa và hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Hoàng Thông, 2014). *B. safensis* AG-131 có khả năng hình thành nội bào tử để tồn

tại lâu trong môi trường bất lợi hoặc trong điều kiện thiếu hụt nguồn dinh dưỡng. Trong nghiên cứu này, các thành phần trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn AG-131 được sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman (Plackett và Burman, 1946) và tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD), nhằm xác định giá trị tối ưu của các thành phần có ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình tạo nội bào tử, là cơ sở để ứng dụng vào nhiều lĩnh vực khác nhau.

Người phân biên: TS. Nguyễn Đức Độ

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn AG-131 được Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây thuộc Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Cách chuẩn bị huyền phù vi khuẩn và môi trường nuôi cấy bào tử được thực hiện giống nghiên cứu của Bí Trường Giang và ctv. (2022)

Xác định mật số tế bào và mật số nội bào tử

Mật số tế bào và mật số nội bào tử được xác định bằng phương pháp trải đếm trên đĩa thạch. Huyền phù vi khuẩn được pha loãng về dãy nồng độ 10^4 , 10^5 , 10^6 để xác định mật số tế bào. Đối với mật số nội bào tử, huyền phù vi khuẩn được đun cách thủy ở 80°C trong 15 phút và pha loãng về dãy nồng độ 10^1 , 10^2 , 10^3 để xác định mật số nội bào tử. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

2.2. Thiết kế ma trận Plackett-Burman và phương pháp RSM-CCD

Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett-Burman (Plackett và Burman, 1946) với 11 yếu tố (Glucose, Peptone, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Yeast Extract, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và thời gian) được khảo sát ở mức dưới (-1) và trên (+1) tương tự nghiên cứu của Bí Trường Giang và ctv. (2022). Từ thí nghiệm sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman chọn ra 3 yếu tố chính và theo dõi sự tương tác giữa chúng. Ba yếu tố ảnh

hưởng chính được xác định giá trị tối ưu ở 5 mức (- α , -1, 0, +1, + α) bằng phương pháp Bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology) - Phương án Cấu trúc có tâm (Central Composite Design) gồm 20 thí nghiệm.

2.3. Kiểm định mô hình trên thực tế

Từ kết quả thực nghiệm theo RSM-CCD, phần mềm Design-Expert 10.0.1.0@ đưa ra giá trị tối ưu của ba yếu tố đề thu được mật số bào tử cao nhất của vi khuẩn AG-131. Thực hiện thí nghiệm kiểm định mô hình tương tự nghiên cứu của Bí Trường Giang và ctv. (2022)

2.4. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Design-Expert (phiên bản 10.0.1.0, Copyright© 2016, Stat-Ease Inc., USA) để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa mật số nội bào tử.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến mật số tế bào và mật số nội bào tử *Bacillus safensis* AG-131 trên môi trường nuôi cấy

Kết quả thí nghiệm sàng lọc Plackett-Burman cho thấy, tổng mật số tế bào nằm trong khoảng từ $5,03 \times 10^7$ đến $6,32 \times 10^8$ (CFU/mL) và tổng mật số nội bào tử nằm trong khoảng từ $1,12 \times 10^4$ đến $8,45 \times 10^4$ (CFU/mL). Kết quả bảng 1 cho thấy, các yếu tố ảnh hưởng (giá trị p - value < 0,05) được chia thành hai nhóm: những yếu tố ảnh hưởng đến mật số tế bào ở mức

cao gồm KH_2PO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; các yếu tố ảnh hưởng ở mức thấp gồm Glucose, Peptone, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Yeast Extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và thời gian. Dựa vào hệ số ảnh hưởng, ba yếu tố Glucose, Peptone và thời gian cho thấy có ảnh hưởng mạnh đến mật số tế bào vi

khuẩn AG-131. Xét về mức độ tin cậy cũng như mức độ ảnh hưởng đến khả năng tạo bào tử của AG-131, ba yếu tố glucose, peptone và $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ có ảnh hưởng quan trọng với các giá trị p -value lần lượt là 0,0134; 0,0255 và 0,0158.

Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng của các yếu tố đối với mật số tế bào trong thí nghiệm Plackett-Burman

Yếu tố	Mức		Mức độ ảnh hưởng đến mật số tế bào		Mức độ ảnh hưởng đến mật số nội bào tử	
	Dưới	Trên	Ảnh hưởng	p -value	Ảnh hưởng	p -value
Glucose (g/L)	2	15	-0,31	0,0007	$3,354 \times 10^{-5}$	0,0134
Peptone (g/L)	3	15	-0,33	0,006	$-1,760 \times 10^{-5}$	0,0255
Yeast Extract (g/L)	1	5	-0,13	0,0037	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0,2	0,5	-	-	$9,287 \times 10^{-5}$	0,0483
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0,5	2	-0,24	0,0011	$3,182 \times 10^{-5}$	0,1389
KH_2PO_4 (g/L)	1	5	0,042	0,0346	$3,232 \times 10^{-5}$	0,1368
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	1	5	-0,18	0,0021	$3,345 \times 10^{-5}$	0,1324
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0,5	1	-	-	$-9,365 \times 10^{-5}$	0,0479
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0	50	0,094	0,0073	$2,839 \times 10^{-5}$	0,0158
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0	50	0,065	0,0151	$1,340 \times 10^{-5}$	0,0335
Thời gian nuôi cấy (giờ)	48	72	-0,43	0,0004	$4,031 \times 10^{-5}$	0,1103
R^2			0,9897		0,9998	
%CV			2,63		2,59	

Glucose được sử dụng như nguồn carbon chính, mật số tế bào sinh dưỡng tăng khi nồng độ glucose tăng (Vladimir Elisashvili *et al.*, 2018) và làm tăng khả năng hô hấp của tế bào (Monterio *et al.*, 2014). Nguồn carbon đóng vai trò quyết định trong quá trình hình thành bào tử của vi khuẩn, sự cạn kiệt nguồn carbon là tác nhân kích thích sự hình thành bào tử ở các

chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. Bên cạnh đó, peptone được xem là nguồn cung cấp đạm chính (Dongsheng zhang *et al.*, 2018), khi hàm lượng peptone cao tạo môi trường thuận lợi cho vi khuẩn phát triển và tăng nhanh về số lượng. Yếu tố thứ ba là Zn^{2+} , yếu tố bổ sung làm tăng khả năng sản sinh bào tử của các loài *Bacillus* và cải thiện tính ổn định của các bào tử.

3.2. Kết quả tối ưu hóa môi trường bằng phương pháp Bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology)

Giá trị của các yếu tố dùng trong thí nghiệm này được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Giá trị của các yếu tố dùng trong phương pháp RSM-CCD

Tên yếu tố	Phạm vi nghiên cứu	Mức				
		- α	-1	0	+1	+ α
Glucose (g/L)	2,93 - 18,1	2,93	6,0	10,5	15,0	18,1
Peptone (g/L)	6,70 - 17,0	6,70	9,0	12,0	15,0	17,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,32 - 3,69	0,32	1,0	2,0	3,0	3,69

Sau khi phân tích thực nghiệm RSM-CCD, phương trình đa thức bậc hai được xác định như sau:

$$Y = - 2,45336 \times 10^5 + 1642,22552x_1 + 38179,71428x_2 + 70072,65836x_3 + 110,83053x_1x_2 - 122,05387x_1x_3 - 5208,33333x_2x_3 - 118,97451x_1^2 - 1095,03139x_2^2 - 346,83909x_3^2$$

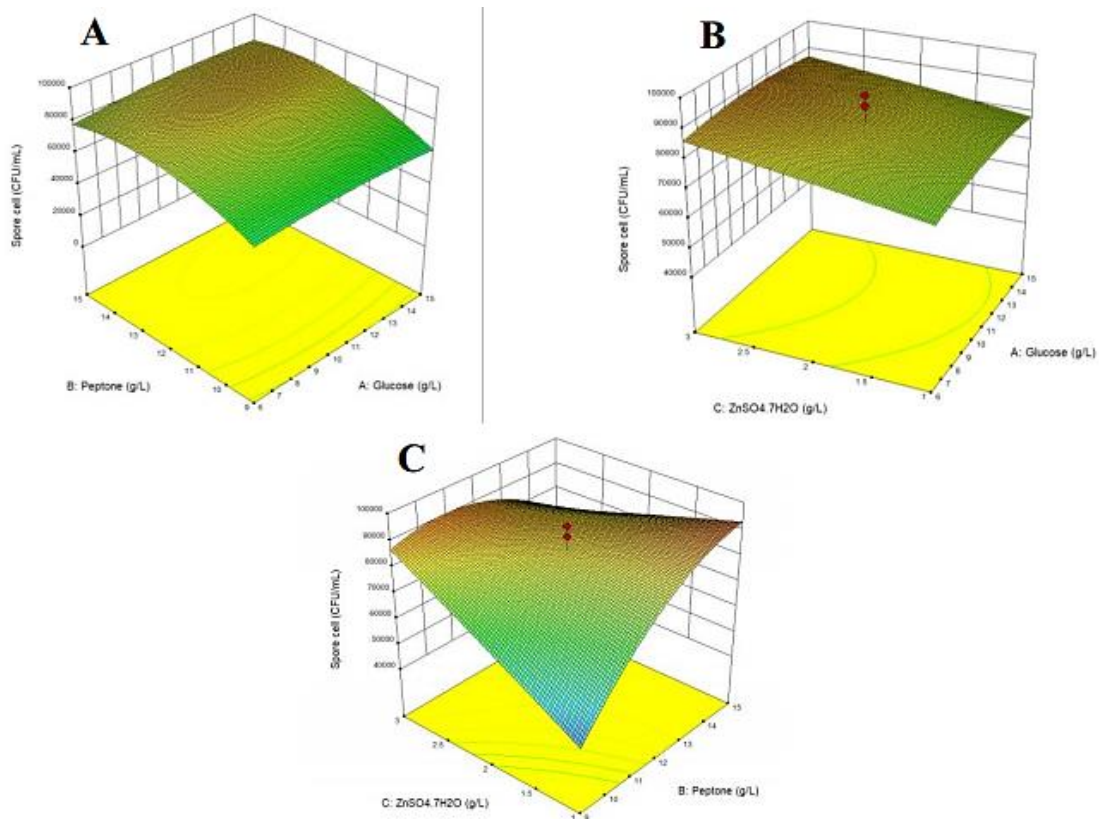
Trong đó: Y là mật số bào tử (CFU/mL), x_1 , x_2 , x_3 lần lượt là glucose, peptone và ZnSO₄.7H₂O.

Bảng 3. Phân tích phương sai ANOVA trong thí nghiệm tối ưu hóa theo phương pháp RSM-CCD

	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	F-value	p-value
Mô hình	4,62x10 ⁹	9	5,13x10 ⁸	7,82	0,0017
x₁- Glucose	1,46x10 ⁷	1	1,46x10 ⁷	0,22	0,6474
x₂- Peptone	8,61x10 ⁸	1	8,61x10 ⁸	13,12	0,0047
x₃- ZnSO₄.7H₂O	3,28x10 ⁸	1	3,28x10 ⁸	5,01	0,0492
x₁x₂	1,79x10 ⁷	1	1,79x10 ⁷	0,27	0,6127
x₁x₃	2,41x10 ⁶	1	2,41x10 ⁶	0,037	0,8517
x₂x₃	1,96x10 ⁹	1	1,96x10 ⁹	29,77	0,0003
x₁²	8,37x10 ⁷	1	8,37x10 ⁷	1,28	0,2852
x₂²	1,40x10 ⁹	1	1,40x10 ⁹	21,34	0,0010
x₃²	1,73x10 ⁶	1	1,73x10 ⁶	0,026	0,8741
Sự không phù hợp	5,087x10 ⁸	5	1,02x10 ⁸	3,45	0,1001
%CV	10,68				

Kết quả bảng 3 với p-value của mô hình là 0,0017 (có ý nghĩa thống kê), cho thấy mô hình có độ phù hợp tốt. Với giá trị %CV là 10,68 cho thấy thí nghiệm thực

hiện đáng tin cậy. Các yếu tố trong thí nghiệm có sự tương tác với nhau theo từng cặp yếu tố và được thể hiện trong biểu đồ đáp ứng bề mặt (hình 1).



Hình 1. Bề mặt đáp ứng của mật số nội bào từ vi khuẩn AG-131 theo các yếu tố
 (A: Glucose và Peptone; B: Glucose và ZnSO₄.7H₂O; C: Peptone và ZnSO₄.7H₂O)

Mỗi hình không gian ba chiều thể hiện hai trong ba yếu tố khảo sát, yếu tố còn lại được cố định ở giá trị mức (0). Qua kết quả tối ưu hóa cho thấy, peptone và ZnSO₄.7H₂O ảnh hưởng đến sự hình thành bào tử ở mức cao (với giá trị *p*-value lần lượt là 0,0047 và 0,0492), nghĩa là lượng peptone và ZnSO₄.7H₂O càng cao thì số lượng bào tử được tạo càng nhiều. Điều này phù hợp với nhận định Zn²⁺ là yếu tố làm tăng sản sinh bào tử của các loài *Bacillus* và cải thiện tính ổn định của các bào tử. Mô hình của sự tương tác giữa peptone và ZnSO₄.7H₂O (x₂x₃) càng chứng tỏ mức độ ảnh hưởng của hai yếu tố này đối với mật số nội bào tử vi khuẩn AG-131, với giá trị *p*-value là 0,003 (< 0,05, mô hình có ý nghĩa về mặt

thống kê). Tuy sự góp phần của glucose trong mô hình tối ưu hóa chưa cho thấy có ý nghĩa về mặt thống kê (với giá trị *p*-value là 0,6474 > 0,05) nhưng xét về mô hình tổng thể vẫn cho thấy mô hình có độ phù hợp cao.

3.3. Kết quả thí nghiệm kiểm định

Theo mô hình dự đoán do phần mềm đề xuất, mật số nội bào tử vi khuẩn đạt mức cao nhất $9,38 \times 10^4$ (CFU/mL) ở các giá trị lần lượt là glucose 13 g/L, peptone 15 g/L và ZnSO₄.7H₂O 1 g/L. Để kiểm chứng mô hình, thí nghiệm được thực hiện với thành phần môi trường tối ưu như trên. Mật số nội bào tử của vi khuẩn sau 48 giờ là $9,78 \times 10^4$ (CFU/mL), tương thích với mật số nội bào tử dự đoán.

4. KẾT LUẬN

Bằng ma trận Plackett-Burman và phương pháp RSM-CCD, ba yếu tố chính ảnh hưởng đến khả năng tạo bào tử của vi khuẩn AG-131 được xác định là glucose, peptone và $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ với các giá trị tối ưu lần lượt là 13 g/L, 15 g/L và 1 g/L, trong đó peptone và $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ có ảnh hưởng lớn đến mật số nội bào tử vi khuẩn AG-131. Kiểm định mô hình áp dụng giá trị tối ưu của các yếu tố khảo sát cho kết quả mật số nội bào tử là $9,78 \times 10^4$ (CFU/mL). Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo liên quan đến nhiệt độ, pH, độ súc khí và tốc độ lắc trong quá trình nuôi lỏng vi khuẩn để kích thích khả năng tạo bào tử của vi khuẩn *B. safensis* AG-131.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bí Trường Giang, Nguyễn Quang Tiến và Nguyễn Đắc Khoa, 2022. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để kích thích khả năng tạo bào tử của vi khuẩn đối kháng *Bacillus subtilis* ST-14

phòng trị bệnh bạc lá lúa. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 21, 26 - 35.

2. Dongsheng, Z., Zheng, W., and Wei, Z., 2018. Effect of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} on growth and sporulation of *Bacillus* sp. L15. *Advances in engineering research*. 163: 416 - 421.
3. Monteiro, S.M.S., Clemente, J.J., Carrondo, M.J.T., and Cunha, A.E., 2014. Enhanced spore production *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. *Advances in Microbiology*. 4: 444 - 454.
4. Nguyễn Hoàng Thông, 2014. Khảo sát khả năng phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn *Bacillus safensis* trên ruộng lúa tỉnh An Giang và Tiền Giang. Luận văn đại học. Trường Đại học Cần Thơ
5. Vladimir, E., Eva, K. and Michael, L.C., 2018. Recent advances in the physiology of spore formation for *Bacillus* probiotic production. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 11:731 - 747
6. Võ Thị Phương Trang, 2013. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn đối kháng trong đất tỉnh An Giang. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ.

ABSTRACT

Optimization of culture medium ingredients to stimulate sporulation of the antagonistic *Bacillus safensis* AG-131 against rice bacterial leaf blight

The antagonistic Bacillus safensis AG-131 isolated from a rice field in An Giang Province of Vietnam could reduce rice bacterial leaf blight. Glucose, peptone and $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ were found to be the major factors having impacts on the sporulation of AG-131 by using the Plackett-Burman matrix. The values of these three factors were optimized using the Response Surface Methodology (RSM) combined with the Central Composite Designs (CCD). Optimal values of glucose, peptone and $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ were 13 g/L, 15 g/L and 1 g/L, respectively. Spore density was 9.78×10^4 CFU/mL using these values.

Keywords: *Bacillus safensis*, bacterial leaf blight, Central Composite Designs, Plackett-Burman matrix, Response Surface Methodology, rice, sporulation.

KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG CỦA HỢP CHẤT POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA TRONG LÁ LÚA Ở CÁC GIAI ĐOẠN BỆNH BẠC LÁ DO *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Trương Văn Xạ^{1*}, Nguyễn Lâm Trang Nhã²,
Nguyễn Quang Khương², Phạm Thảo Nguyên²,
Nguyễn Đắc Khoa², Nguyễn Đức Độ²

¹ Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

² Trường Đại học Cần Thơ

* E-mail liên hệ: xatv@vlute.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu hàm lượng các hợp chất polyphenol và khả năng kháng oxy hóa của lá lúa bệnh bạc lá, kết quả thu được cho thấy nồng độ các chất giữa các nghiệm thức đều biến thiên tùy vào nhóm chất, điều kiện cây lúa có hay không chủng bệnh hoặc theo giai đoạn bệnh khác nhau không theo xu hướng nhất định. Nhưng với hai thời điểm là 7 và 14 ngày sau chủng bệnh (NSCB), thì nghiệm thức đối chứng dương có hàm lượng các chất thấp và khả năng kháng oxy hóa yếu hơn so các nghiệm thức còn lại, kéo dài đến 21 NSCB. Kết quả khá tương đồng thí nghiệm khảo sát về chiều dài vết bệnh, thì nghiệm thức đối chứng dương có chiều dài vết bệnh ngắn hơn so với nghiệm thức còn lại.

Từ khóa: bệnh bạc lá, kháng oxy hóa, polyphenol tổng, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn Gram âm *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra (Swings *et al.*, 1990). Các biện pháp phòng trừ bệnh này như sử dụng các loại thuốc hoá học (Khan *et al.*, 2015), sử dụng giống mang gen kháng (Kumar *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2015), sử dụng các vi sinh vật đối kháng để quản lý bệnh (Beric *et al.*, 2012; Khoa *et al.*, 2018) và sử dụng các biện pháp kích kháng bệnh bạc lá lúa

(Kagale *et al.*, 2004; Khoa *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, trong cây lúa có thể tích lũy một lượng lớn các chất chuyển hóa thứ cấp nhóm polyphenol như phenolic acid, flavonoid, tannin, coumarin (Walter and Marchesan, 2011) có liên quan đến các chức năng sinh học và miễn dịch. Các hợp chất này có nhiều hoạt tính sinh học như là kháng oxy hóa, kháng viêm, giải độc tự nhiên cho cây do stress oxy hóa hoặc sự tấn công của dịch hại (Degirmenci and Erkurt, 2020; Walter and Marchesan, 2011). Vì vậy, mục đích của nghiên cứu là

Người phân biên: TS. Võ Văn Song Toàn

hướng tới khảo sát các hợp chất nhóm polyphenol và khả năng kháng oxy hóa của các hợp chất này trong cây lúa ở các thời điểm do bệnh bạc lá gây ra.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật Liệu

Giống lúa Jasmine 85 (Viện Lúa đồng bằng Sông Cửu Long) và vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) của nhóm nghiên cứu bệnh học thực vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm khảo sát bệnh bạc lá trên lúa trồng trong nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại với 2 nghiệm thức là: (1) đối chứng âm (có chủng bệnh, phun nước cất) và (2) đối chứng dương (có chủng bệnh, phun thuốc Starner 20WP), được tiến hành và theo dõi chỉ tiêu mô tả bởi Khoa *et al.* (2017) và N.Đ. Khoa (2005).

2.2.2. Phương pháp phân tích các hợp chất polyphenol trong lá lúa

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức là: (1) nghiệm thức đối chứng nền (không chủng bệnh), (2) nghiệm thức đối chứng âm (có chủng bệnh), (3) nghiệm thức đối chứng dương (thuốc Starner 20WP) với 3 lần lặp lại. Cách tiến hành và phân tích lá lúa được mô tả theo N.L.T. Nhã (2022). Các phương pháp phân tích định lượng các hợp chất được mô tả như sau: polyphenol tổng - Yadav *et al.* (2011) và

hiệu chỉnh theo H.T. Duy (2020), flavonoid tổng - Chang *et al.* (2002) và Saeed *et al.* (2012), coumarin tổng - Elba *et al.* (2012) và Li *et al.* (2019), tannin tổng - Medini *et al.* (2014).

2.2.3. Phương pháp khảo sát khả năng kháng oxy hóa với gốc tự do DPPH của dịch trích lá lúa

Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH của các nghiệm thức được thực hiện theo phương pháp của Kedare and Singh (2011) và hiệu chỉnh theo Huỳnh Thanh Duy và ctv. (2020).

2.2.4. Phân tích số liệu

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0 và so sánh trung bình bằng kiểm định Turkey.

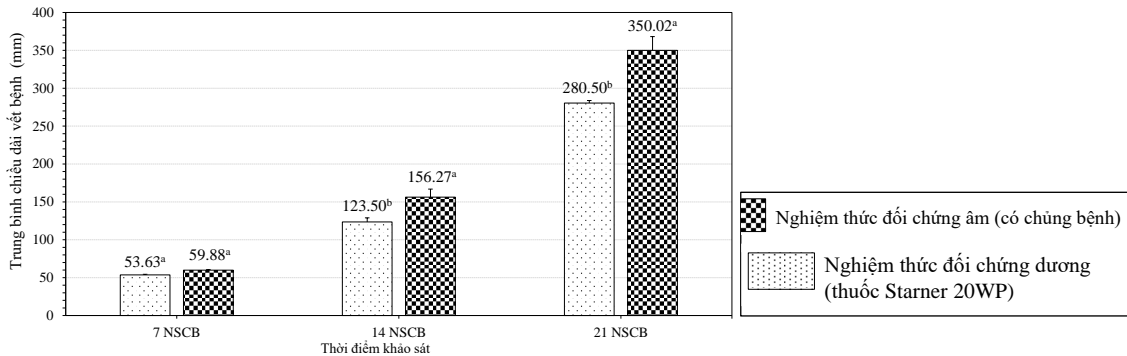
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát sự biểu hiện bệnh cháy bìa lá lúa

Kết quả thí nghiệm cho thấy, trung bình chiều dài vết bệnh của nghiệm thức đối chứng dương luôn nhỏ hơn so với đối chứng âm tại tất cả các thời điểm khảo sát (hình 1). Trong đó, tại thời điểm 14 và 21 NSCB ghi nhận chiều dài vết bệnh khác biệt ý nghĩa thống kê. Trong thí nghiệm này, thuốc Starner được phun thời điểm 5, 10 và 15 NSCB với liều lượng đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Việc sử dụng thuốc hóa học này có tác dụng tiêu diệt trực tiếp mầm bệnh *Xoo* khi tiếp xúc qua lá để tránh lây lan qua các lá lúa khỏe; đồng thời thuốc còn có tác dụng lưu dẫn để hạn chế khả năng gây hại của *Xoo* khi

xâm nhiễm thành công vào mạch xylem của cây lúa (Khan *et al.*, 2012; Syed Ab Rahman *et al.*, 2014). Trung bình chiều dài vết bệnh cháy bìa lá có sự khác biệt ở hai nghiệm thức như khảo sát. Do đó, nghiên cứu tiếp tục sử dụng mẫu lá lúa ở

các thời điểm này để khảo sát hàm lượng một số hợp chất thực vật thứ cấp có hoạt tính sinh học nhằm làm rõ cơ chế dịch tễ học cây lúa với sự tấn công của mầm bệnh *Xoo* ở các giai đoạn 7, 14 và 21 NSCB.



Hình 1. Chiều dài vết bệnh của hai nghiệm thức Starner và đối chứng âm ở 7, 14 và 21 NSCB

3.2. Hàm lượng các hợp chất thực vật có trong mẫu lá lúa

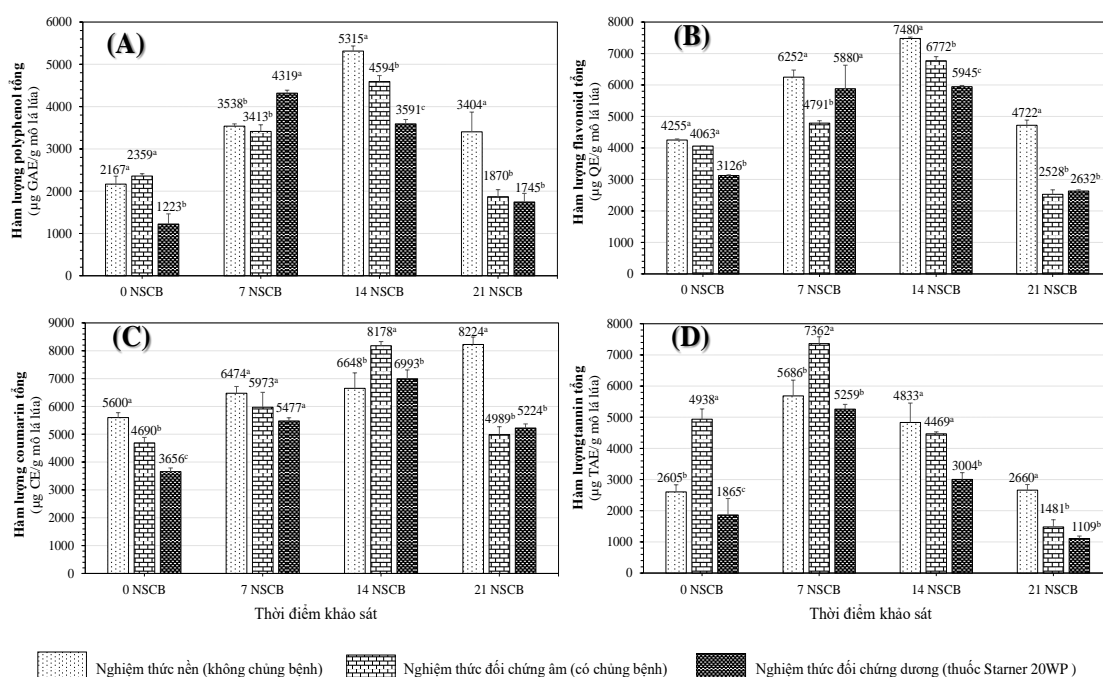
*** Kết quả định lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng, coumarin tổng và tannin tổng trong mẫu mô lá lúa ở giai đoạn 0, 7, 14 và 21 NSCB**

Ở 0 NSCB là thời điểm chưa có sự xuất hiện của vi khuẩn *Xoo* thì hàm lượng polyphenol và hàm lượng flavonoid tổng của 2 nghiệm thức đối chứng nền và đối chứng âm có giá trị tương đương nhau, trong khi đó nghiệm thức Starner ghi nhận thấp hơn (hình 2A, 2B). Nhưng khi mầm bệnh tấn công và lan rộng trên lá lúa thì các giá trị này thay đổi theo xu hướng tăng ở thời điểm 7 và 14 NSCB, sau đó giảm mạnh ở 21 NSCB. Trong khi đó, hàm lượng coumarin tổng và tannin tổng ghi nhận khác biệt ý nghĩa ở cả ba nghiệm thức và nghiệm thức Starner vẫn ghi nhận ở mức thấp (hình 2C, 2D).

Ở 7 NSCB, ghi nhận hàm lượng polyphenol tăng mạnh nhất ở nghiệm thức thuốc Starner; nghiệm thức đối chứng (ĐC) nền và nghiệm thức ĐC âm có hàm lượng polyphenol tổng tăng khác biệt không ý nghĩa (hình 2A). Hàm lượng flavonoid của nghiệm thức thuốc Starner tương đương so với nghiệm thức ĐC nền, nhưng nghiệm thức âm ghi nhận giảm thấp nhất (hình 2B). Ngược lại với hàm lượng flavonoid thì hàm lượng tannin ghi nhận nghiệm thức đối chứng âm tăng mạnh nhất (hình 2D). Trong khi đó, hàm lượng coumarin ghi nhận tương đương ở cả 3 nghiệm thức khảo sát (hình 2C). Như vậy, so với thời điểm 0 NSCB thì nghiệm thức sử dụng thuốc Starner có sự tăng tổng hợp polyphenol ở mức rất cao. Nếu so sánh với chiều dài vết bệnh của cùng nghiệm thức thuốc Starner ở thời điểm 7 NSCB (hình 1) thì chiều dài vết bệnh ngắn

hơn so với nghiệm thức đối chứng âm. Ở 14 NSCB, hàm lượng polyphenol, flavonoid và tannin đều ghi nhận thấp hơn so với đối chứng nền; trong đó, nghiệm thức thuốc Starner ghi nhận thấp nhất. Trong khi đó, hàm lượng coumarin của nghiệm thức thuốc Starner ghi nhận tương đương đối chứng nền. Ở 21 NSCB, hàm lượng polyphenol, flavonoid, coumarin và tannin của nghiệm thức thuốc Starner tương đương so với nghiệm thức đối chứng âm, cả hai đều ghi nhận giảm thấp hơn so với nghiệm thức nền. Kết quả khi phun Starner đã tác động tăng lượng polyphenol ở giai đoạn đầu khi mầm bệnh tấn công (7 NSCB), sau đó giảm mạnh ở các giai đoạn 14 và 21 NSCB, ngược lại với cây lúa bình thường bị bệnh tấn công

thì hàm lượng polyphenol ghi nhận thấp hơn so với cây lúa không bệnh. Nếu so sánh với chiều dài vết bệnh ở hình 1 thì hàm lượng polyphenol có sự tương quan cùng xu hướng, cụ thể: chiều dài vết bệnh ngắn khi hàm lượng polyphenol cao ở giai đoạn đầu khi mầm bệnh tấn công (nghiệm thức thuốc Starner, thời điểm 7 NSCB, hình 2A) và sau đó giảm mạnh chiều dài vết bệnh khi cây lúa không tăng được lượng polyphenol ở giai đoạn đầu (nghiệm thức đối chứng âm, ở 7 NSCB, hình 2A). Như vậy có thể thấy Starner ảnh hưởng sự tăng sinh polyphenol giai đoạn đầu khi mầm bệnh tấn công. Khi hàm lượng polyphenol tăng cao trong cây lúa sẽ tăng khả năng ức chế sự phát triển của mầm bệnh.



Hình 2. Hàm lượng các hợp chất polyphenol trong mẫu lá lúa ở 0, 7, 14 và 21 NSCB

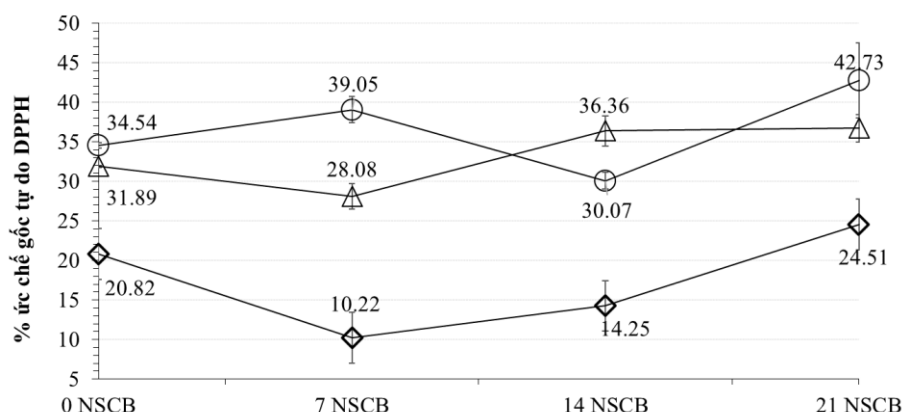
((A): hàm lượng polyphenol tổng; (B): hàm lượng flavonoid tổng; (C): hàm lượng coumarin tổng; (D): hàm lượng tannin tổng)

Theo Nisha *et al.* (2012) và Kagale *et al.* (2004), cũng ghi nhận hàm lượng phenolic trong cây lúa tăng cao ở giai đoạn từ 0 đến 96 giờ sau chủng bệnh với vi khuẩn *Xoo*; sau đó hàm lượng phenolic giảm đến thời điểm khảo sát là 120 giờ. Theo Cho and Lee (2015), các hợp chất thuộc nhóm polyphenol trong cây lúa có thể góp phần biểu hiện đặc tính kháng bệnh hay miễn cảm với mầm bệnh của cây lúa; thông thường ở các giống lúa kháng bệnh thì hàm lượng polyphenol sẽ tăng tổng hợp mức cao khi mầm bệnh tấn công và xâm nhiễm; xu hướng này ngược lại ở giống lúa miễn cảm với mầm bệnh. Như vậy, ở giai đoạn đầu khi mầm bệnh tấn công (7 NSCB) thì hàm lượng polyphenol, flavonoid, coumarin trong lá lúa đều ghi nhận thấp hơn so với cây lúa bình thường. Ngược lại, hàm lượng tannin trong cây lúa bị bệnh tăng cao hơn so với đối chứng nền. Ở giai đoạn 14 và 21 NSCB thì hàm lượng tất cả các hợp chất này đều giảm thấp hơn so với đối chứng nền, điều này chứng tỏ các hợp chất nhóm polyphenol có liên quan trực tiếp với sự biểu hiện bệnh do *Xoo* gây ra trên lá lúa tại các thời điểm khác nhau.

3.3. Khả năng kháng oxy hóa với gốc tự do DPPH của dịch trích lá lúa ở giai đoạn 7, 14 và 21 NSCB

Ở nghiệm thức ĐC nền, phần trăm khử DPPH ghi nhận đạt 20,82% (0 NSCB), sau đó giảm xuống 10,22% (7 NSCB) và ghi nhận tăng liên tục ở 14 và 21 NSCB. Nếu so sánh với hàm lượng các hợp chất

polyphenol (hình 2) thì ghi nhận có sự tương đồng; ở thời điểm 0 NSCB hàm lượng polyphenol, flavonoid, coumarin và tannin trong lá lúa rất thấp do đó khả năng kháng oxy hóa được ghi nhận tương ứng. Ở nghiệm thức thuốc Starner ghi nhận khả năng kháng oxy hóa tăng liên tục từ 0 đến 21 NSCB. Nếu so sánh với hàm lượng một số hợp chất polyphenol (hình 2) và trung bình chiều dài vết bệnh (hình 1) thì ghi nhận sự tương quan với nhau. Ở thời điểm 7 NSCB, khi có mầm bệnh bắt đầu tấn công mạnh và hàm lượng polyphenol cũng được ghi nhận ở mức cao, do đó khả năng kháng oxy hóa cũng tăng hơn so với thời điểm 0 NSCB. Ở thời điểm 14 và 21 NSCB, hàm lượng polyphenol giảm thấp nhưng vẫn ghi nhận khả năng kháng oxy hóa tăng liên tục, điều này có thể do vi khuẩn *Xoo* đã tác động đến lượng polyphenol sinh ra của cây lúa để dễ tấn công và gây hại lá lúa, nhưng lại kích hoạt cơ chế kháng oxy hóa hay kháng viêm, giải độc khác nhau; do đó nghiên cứu vẫn ghi nhận khả năng kháng oxy hóa tiếp tục tăng với nguyên nhân chưa xác định. Theo Walter and Marchesan (2011) và Wojdylo *et al.* (2007), hàm lượng các hợp chất polyphenol tồn tại trong cây lúa tỷ lệ với khả năng kháng oxy hóa. Theo Ab Rahman *et al.* (2014), khả năng kháng oxy hóa của cây lúa luôn duy trì mức độ tăng từ khi mầm bệnh tấn công đến biểu hiện bệnh (120 giờ sau chủng bệnh), xu hướng tăng này tỉ lệ với nồng độ polyphenol, tannin và flavonoid trong lá lúa.



Hình 3. Khả năng kháng oxy hóa với gốc tự do DPPH của lá lúa tại 0, 7, 14 và 21 NSCB

4. KẾT LUẬN

Chiều dài vết bệnh của nghiệm thức thuốc Starner 20WP luôn ngắn hơn so với nghiệm thức đối chứng âm ở tất cả các thời điểm khảo sát. Ở giai đoạn đầu khi vi khuẩn *Xoo* tấn công vào cây lúa (7 NSCB) thì hàm lượng polyphenol, flavonoid, coumarin trong lá lúa đều ghi nhận nồng độ khá thấp so với cây lúa không bị bệnh, ngoại trừ tannin ở đa số các thời điểm khảo sát. Khi cây lúa bị bệnh nhưng được phun thuốc hóa học Starner thì ghi nhận hàm lượng polyphenol tăng cao hơn so với đối chứng nền (7 NSCB). Đến giai đoạn 14 và 21 NSCB thì hàm lượng các hợp chất này đều ghi nhận giảm thấp hơn so với đối chứng nền, thấp nhất được ghi nhận khi phun thuốc Starner. Khả năng kháng oxy hóa của dịch trích lá lúa ghi nhận tăng liên tục từ 0 đến 21 NSCB. Trong đó, nghiệm thức thuốc Starner 20WP có phần trăm ức chế gốc tự do thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng âm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ab Rahman, S.F.S., Sijam, K. and Omar, D., 2014. Identification and antibacterial activity

of phenolic compounds in crude extracts of *Piper sarmentosum* (Kadok). *J. Pure Appl. Microbiol*, 8, 483 - 490.

2. Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L., Degrassi, G., Myers, M., et al., 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 25 - 31.
3. Chang, C. - C., Yang, M. - H., Wen, H. - M. and Chern, J. - C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178 - 182.
4. Cho, M. - H. and Lee, S. - W., 2015. Phenolic Phytoalexins in Rice: Biological Functions and Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29120 - 29133. <https://doi.org/10.3390/ijms161226152>
5. Degirmenci, H. and Erkurt, H., 2020. Chemical profile and antioxidant potency of *Citrus aurantium* L. flower extracts with antibacterial effect against foodborne pathogens in rice pudding. *Lwt*, 126, 109273.
6. Huỳnh Thanh Duy, Lương Phong Dũ, Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Đức Độ, 2020. Khảo sát thành phần hóa học và khả năng kháng oxy hóa của các phân đoạn cao chiết lá già từ cây bình bát nước (*Annona glabra* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 4(1), 1668 - 1678.

7. Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R. and Samiyappan, R., 2004. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 91 - 100.
8. Kedare, S.B. and Singh, R.P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412 - 422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
9. Khan, J.A., Siddiq, R., Arshad, H.M.I., Anwar, H.S., Saleem, K. and Jamil, F.F., 2012. Chemical control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pak J Phytopathol*, 24(2), 97 - 100.
10. Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A. and Khan, N.A., 2015. Salicylic acid - induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE), 1 - 17.
11. Khoa, N.Đ., Xạ, T.V. and Hào, L.T., 2017. Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *K. pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *X. oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100, 57 - 66..
12. Kumar, A., Kumar, R., Sengupta, D., Das, S.N., Pandey, M.K., Bohra, A., et al., (2020). Deployment of genetic and genomic tools toward gaining a better understanding of rice-*X. oryzae* pv. *oryzae* interactions for development of durable bacterial blight resistant rice. *Frontiers in Plant Science*, 11(August), 1 - 23.
13. Li, G.J., Wu, H. - J., Wang, Y., Hung, W.L. and Rouseff, R.L., 2019. Determination of citrus juice coumarins, furanocoumarins and methoxylated flavones using solid phase extraction and HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Food Chemistry*, 271, 29 - 38.
14. Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R. and Abdelly, C., 2014. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *L. delicatulum*. *J.O. Taibah University for Science*, 8(3), 216 - 224.
15. Nguyễn Đắc Khoa, 2005. Effect of single resistance genes and their pyramid on the diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* population under field conditions as revealed by insertion sequence-polymerase chain reaction (IS-PCR). Philippines Univ. Los Baños, College, Laguna (Philippines).
16. Nguyễn Lâm Trang Nhã, 2022. Khảo sát hàm lượng các hợp chất nhóm polyphenol và khả năng kháng oxy hóa từ cây lúa (*Oryza sativa* L.) sau khi kích kháng. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Cần Thơ.
17. Nisha, S., Revathi, K., Chandrasekaran, R., Kirubakaran, S.A., Sathish - Narayanan, S., Stout, M.J. and Senthil-Nathan, S., 2012. Effect of plant compounds on induced activities of defense-related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. *Physiological and molecular plant pathology*, 80, 1 - 9.
18. Saeed, N., Khan, M.R. and Shabbir, M., 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 221.
19. Swings, J., Van D.M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T.W. and Kersters, K., 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*X. campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*X. campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *X. oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 309 - 311.
20. Syed Ab Rahman, S.F., Sijam, K. and Omar, D., 2014. Chemical composition of *Piper sarmentosum* extracts and antibacterial activity against the plant pathogenic bacteria *Pseudomonas fuscovaginae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Plant Diseases*

- and Protection*, 121(6), 237 - 242. <https://doi.org/10.1007/BF03356518>
21. Walter, M. and Marchesan, E., 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 371 - 377. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000200020>
22. Wojdylo, A., Oszmianski, J. and Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940 - 949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
23. Yadav, R.N.S. and Agarwala, M., 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytology*, 3(12).
24. Zhang, F., Zhuo, D.L., Zhang, F., Huang, L.Y., Wang, W.S., Xu, J.L., *et al.*, 2015. *Xa39*, a novel dominant gene conferring broad - spectrum resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Plant Pathology*, 64(3), 568 - 575.

ABSTRACT

Evaluation of total polyphenolic compounds and antioxidant activities in rice leaves inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial leaf blight

*This study aims at determining polyphenolic compounds and antioxidant activities from leaves of *Oryza sativa* L. based on bacterial leaf blight disease (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). All treatments displayed of polyphenol, coumarin, flavonoid and tannin compounds and antioxidant activity with 4 periods of the day after inoculation (DAI). In 7 and 14 DAI, the positive treatment show concentration of these compounds and antioxidant activities has lower than the others until 21 DAI. An experiment about length of the lesion, also has the same result indicated that the positive treatment has smaller than the negative treatment in 3 periods of DAI.*

Keywords: *antioxidant activities, bacterial leaf blight, polyphenol compound, Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH HÉO XANH TRÊN CÂY KHOAI LANG VÀ PHÒNG TRỪ BỆNH BẰNG THỰC KHUẨN THỂ TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Nguyễn Văn Phong¹, Huỳnh Thị Kim Ngân¹,
Đoàn Thị Kiều Tiên^{1*}, Nguyễn Thị Thu Nga^{1*}

¹Khoa Bảo vệ thực vật, Trường Nông nghiệp,
Trường Đại học Cần Thơ

* E-mail liên hệ: ntnnga@ctu.edu.vn;
dtktien@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Bệnh héo xanh trên cây khoai lang là một trong những bệnh quan trọng trên cây khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Mục đích của nghiên cứu là xác định tác nhân gây bệnh héo trên cây khoai lang và sử dụng thực khuẩn thể phòng trị bệnh này trong điều kiện nhà lưới. Bệnh héo xanh trên khoai lang được ghi nhận do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* dựa vào qui trình Koch và kỹ thuật sinh học phân tử với cặp môi đặc hiệu PS96-H/PS96-I. Tiếp theo, hiệu quả của thực khuẩn thể phòng trị bệnh héo xanh được thực hiện trong điều kiện nhà lưới. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm sáu nghiệm thức (thực khuẩn thể đơn TKT Φ1, TKT Φ2 TKT Φ4, hỗn hợp TKT, oxolinic acid và đối chứng), với bốn lần lặp lại. Kết quả cho thấy đơn TKT hoặc hỗn hợp ba TKT có tỉ lệ bệnh, cấp bệnh và AUDPC thấp hơn đối chứng. Trong đó, hai nghiệm thức TKT Φ1 và hỗn hợp TKT cho hiệu quả giảm bệnh tốt hơn.

Từ khóa: bệnh héo xanh, cây khoai lang, *Ralstonia solanacearum*, thực khuẩn thể.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, bệnh héo xanh trên khoai lang ngày càng lan rộng và ảnh hưởng đến các vùng sản xuất khoai lang ở các nước. Theo Chen (2012) và Jiang (2017) thì bệnh xuất hiện và gây hại trên khoai lang với tỉ lệ khoảng 30 - 80%, thậm chí có thể lên tới 100%. Trong xu hướng tiến đến nền nông nghiệp bền vững và an toàn, một số chế phẩm sinh học

nhằm cân bằng hệ vi sinh vật đất đã được phát triển ở Việt Nam và trên thế giới. Thực khuẩn thể (TKT) được sử dụng như tác nhân kiểm soát sinh học (Jones *et al.*, 2006). TKT là loại virus đặc biệt ký sinh chuyên tính trên một loại vi khuẩn (Tanaka *et al.*, 1990). Ngày nay, thuốc trừ vi khuẩn có nguồn gốc từ TKT được thương mại tại Mỹ như sản phẩm AgriPhage phòng trừ bệnh vi khuẩn trên cà chua và ớt (Nagy *et al.*, 2012). Tại Việt Nam, Nguyễn Thúy An và *ctv.* (2017),

Đoàn Thị Kiều Tiên và ctv. (2017) đã sử dụng TKT kiểm soát hiệu quả bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên vạt thọt và dưa leo ở điều kiện nhà lưới. Chính vì vậy, nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh héo xanh trên khoai lang và nghiên cứu hiệu quả của thực khuẩn thể trong quản lý bệnh héo xanh được thực hiện nhằm hướng đến mục tiêu quản lý bệnh này trên khoai lang theo hướng thân thiện với môi trường.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm và nhà lưới Khoa Bảo vệ thực Vật, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1. Vật liệu

Mẫu cây khoai lang bị bệnh héo xanh trên ruộng được thu thập tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Giống khoai lang tím nhạt (giống địa phương). Giá thể trồng cây khoai lang gồm đất và phân rom oai mục (tỉ lệ 2:1), nguồn thực khuẩn thể (TKT): $\Phi 1$, $\Phi 2$ và $\Phi 4$ (được cung cấp bởi Khoa Bảo vệ thực vật).

2.2. Phân lập và xác định tác nhân gây bệnh héo xanh trên cây khoai lang

Thu mẫu: mẫu bệnh được thu thập trên các dây khoai lang bị héo xanh vào giai đoạn từ 25 - 45 ngày sau khi trồng và phân lập theo phương pháp của Burgess *et al.* (2008). Mẫu bệnh được khử trùng bề mặt mẫu thân bằng cồn 70°, chọn phần mạch gỗ hóa nâu và cắt mẫu thành từng mẫu nhỏ khoảng 2 mm x 2 mm, hòa 1 - 2 giọt nước cất vô trùng vào mẫu bệnh và

đợi trong vòng 3 phút để vi khuẩn khuếch tán vào nước, sau đó rút giọt huyền phù chứa vi khuẩn nhỏ lên rìa của đĩa thạch chứa môi trường King B 2% và thực hiện phân tán giọt huyền phù vi khuẩn bằng que cấy vi khuẩn theo phương pháp vạch tách rỗng, đĩa được đặt ở nhiệt độ phòng. Sau 48 giờ, thực hiện tách rỗng vi khuẩn gây bệnh dựa vào sự hiện diện mật số cao trên mẫu phân lập. Các mẫu vi khuẩn được xác định Gram, phản ứng siêu nhạy cảm trên cây ký chủ để loại trừ vi khuẩn hoại sinh (Janse, 2005) và cuối cùng vi khuẩn được trữ ở 4°C làm vật liệu nghiên cứu.

Xác định tác nhân gây bệnh héo xanh khoai lang theo qui trình Koch (Agrios, 2005):

- Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn gây bệnh: vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường King'B 2% agar trong 48 giờ. Sau đó hòa thành huyền phù vi khuẩn bằng nước cất vô trùng và pha loãng để huyền phù đạt độ đục $OD_{600nm} = 0,4$ bằng máy đo quang phổ tương ứng 8×10^8 CFU/ml (Nguyễn Văn Phong, 2021)

- Chuẩn bị dây khoai lang: khoai lang được trồng từ hom giống sạch bệnh và trồng vào chậu chứa đất đã được hấp khử trùng.

- Lây bệnh nhân tạo: thực hiện tưới 5 ml huyền phù vi khuẩn xung quanh gốc dây khoai lang ở giai đoạn 7 ngày sau khi trồng khi cây đã bén rễ. Sau đó chậu được đặt trong điều kiện nhà lưới có mái che.

Chỉ tiêu ghi nhận: quan sát triệu chứng héo và phần thối bó mạch, tái phân lập tác nhân gây bệnh.

Xác định tác nhân gây bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử với cặp môi đặc hiệu:

mẫu vi khuẩn được phân lập sau khi kiểm tra khả năng gây bệnh bằng quy trình Koch được dùng để định danh. Thực hiện ly trích DNA vi khuẩn bằng nhiệt theo phương pháp của Junior *et al.*, (2016), nồng độ DNA được khuếch đại với cặp môi đặc hiệu (PS96-H/PS96-I) cho vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: giai đoạn khởi đầu 96°C trong 3 phút, 96°C trong 25 giây (biến tính), 64°C trong 30 giây (gắn môi), 72°C trong 30 giây (kéo dài), cuối cùng là 72°C trong 5 phút (kéo dài DNA) và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong TAE 1% (Tris-HCl, acid acetic, EDTA), sau đó chạy điện di ở hiệu điện thế 60 Voltages trong 70 phút. Cuối cùng nhuộm gel trong dung dịch ethium bromide (0,5 µg/mL) và đọc kết quả bằng máy chụp gel UV₂₀₀₀. Sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp môi PS96-H/PS96-I có trọng lượng phân tử 148 bp (Schaad *et al.*, 2001).

2.3. Đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh héo xanh trên khoai lang do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* của các dòng thực khuẩn thể triển vọng

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 6 nghiệm thức gồm bốn nghiệm thức xử lý thực khuẩn thể (TKT) ký sinh vi khuẩn *R. solanacearum* (TKT Φ1; TKT Φ2; TKT Φ4 và hỗn hợp ba TKT (Φ1, Φ2, Φ4 với tỉ lệ 1:1:1) ở mật số 10⁸ pfu/ml, nghiệm thức thuốc hóa học Starner và nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức có 4 lần lặp lại, mỗi lần

lặp lại là một chậu được trồng 5 dây khoai lang.

- **Chuẩn bị đất:** đất được trộn với phân rơm oai mục với tỉ lệ 2:1 (2 đất, 1 phân hữu cơ) và mang đi hấp khử trùng bằng máy thanh trùng ước ở 121°C trong 30 phút. Sau đó đất được trộn đều và cho vào túi trồng với khối lượng 2,5 kg/túi.

- **Chuẩn bị cây trồng:** dây khoai lang được cắt vè và trồng vào túi có đất thanh trùng đã được chuẩn bị sẵn, tưới mỗi ngày 1 lần. Sau 28 ngày thì bắt đầu thí nghiệm.

- **Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn gây bệnh:** tương tự mục 2.2.

- **Chuẩn bị huyền phù TKT:** các nguồn thực khuẩn thể được nhân nuôi trong môi trường King's B lỏng có chứa 100 µl huyền phù vi khuẩn, lắc qua đêm. Xác định mật số TKT bằng phương pháp pha loãng và trải đĩa, thực hiện pha loãng để đưa về mật số 10⁸ pfu/mL (Nga *et al.*, 2021).

- **Phương pháp xử lý TKT, lây bệnh nhân tạo và xử lý thuốc hóa học:** tưới 50 ml huyền phù thực khuẩn thể từng loại ở mật số 10⁸ (pfu/ml) vào từng chậu khoai lang tương ứng với từng nghiệm thức. Một giờ sau khi tưới TKT thì tiến hành lây bệnh nhân tạo bằng cách tưới 50 ml huyền phù vi khuẩn gây bệnh (OD₆₀₀ = 0,4 cho tất cả các nghiệm thức) (Nguyễn Thúy An và ctv. (2017). Riêng nghiệm thức xử lý oxolinic axit khi bệnh xuất hiện sau khi lây bệnh 14 ngày mới thực hiện tưới 50 ml/chậu (với nồng độ 1 g/lít).

- **Ghi nhận chỉ tiêu:**

+ Tỉ lệ bệnh: đếm số dây bị bệnh trên tổng số dây của một chậu.

+ Cấp bệnh: ghi nhận theo thang đánh giá của Ateka *et al.* (2001) gồm các cấp độ bệnh như sau: cấp 0 (không bệnh), cấp 1 (có 1 lá héo), cấp 2 (có 2 lá héo), cấp 3 (tất cả các lá đều héo trừ 2 lá trên ngọn), cấp 4 (tất cả các lá đều héo), cấp 5 (cây bị chết).

+ Chỉ số tích lũy bệnh AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve): được tính theo công thức của Shanner and Finney (1980).

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

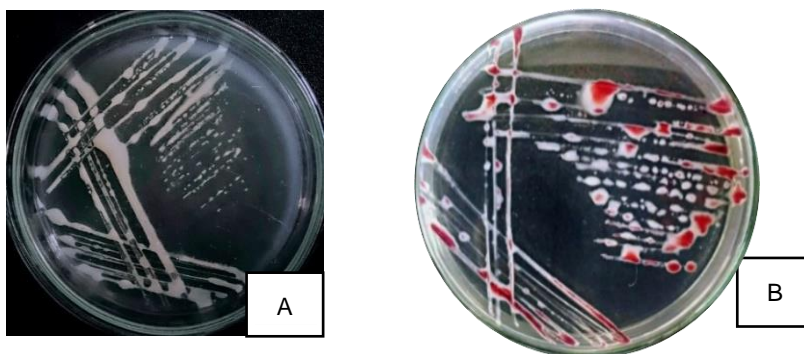
Trong đó:

n: số lần lấy chỉ tiêu;

y_i : tỉ lệ bệnh tại lần đo thứ i;

t_i : thời gian tại lần đo thứ i.

- Xử lý số liệu bằng Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 1. Đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên khoai lang

(A: khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường King's B sau 48 giờ phát triển;
B: khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường TZC sau 48 giờ phát triển)

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định tác nhân gây bệnh héo xanh trên cây khoai lang

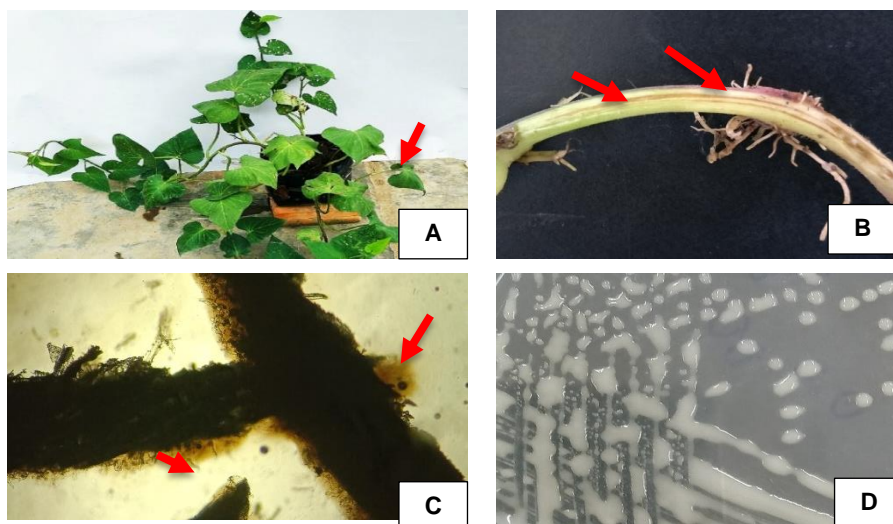
Mẫu bệnh héo xanh trên khoai lang được thu tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Kết quả tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng kem, dạng trơn láng không đồng đều trên môi trường King's B agar 2% trong 72 giờ. Tiếp theo, nuôi cấy vi khuẩn này trên môi trường TZC, khuẩn lạc hình thành có màu trắng đục hoặc kem với tâm màu hồng, hình dạng không đồng đều, trơn láng. Tương tự với miêu tả của Kelman (1954) là vi

khẩn *Ralstonia solanacearum* sẽ hình thành khuẩn lạc màu trắng có tâm màu hồng là chủng vi khuẩn có độc lực cao (hình 1). Vì vậy, qua kết quả về triệu chứng héo xanh với biểu hiện đặc trưng là cây héo vẫn còn xanh với mạch gỗ hóa nâu cùng với đặc điểm khuẩn lạc có thể bước đầu kết luận bệnh héo xanh trên khoai lang do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

Kết quả lây nhiễm vi khuẩn trên cây khoai lang được trồng khoảng 7 ngày trong điều kiện nhà lưới trên nền đất vô trùng. Sau 12 ngày sau cây biểu hiện triệu chứng héo rũ bắt đầu từ lá chân và

chạy dài lên toàn cây, cây héo vào lúc trưa nắng và trở lại bình thường vào buổi chiều mát. Thân dây khoai lang bị héo, mạch dẫn hóa nâu giống như triệu chứng biểu hiện trên dây khoai lang tại ruộng và cũng quan sát được hiện tượng

dòng dịch khuẩn tại mạch dẫn hóa nâu (hình 2A, B, C). Phân lập từ dây khoai lang bị héo trong thí nghiệm khuẩn lạc hình thành giống như khuẩn lạc được phân lập từ khoai lang bị bệnh trên đồng ruộng (hình 1D).



Hình 2. Triệu chứng héo xanh trên khoai lang ở 12 ngày sau khi lây bệnh

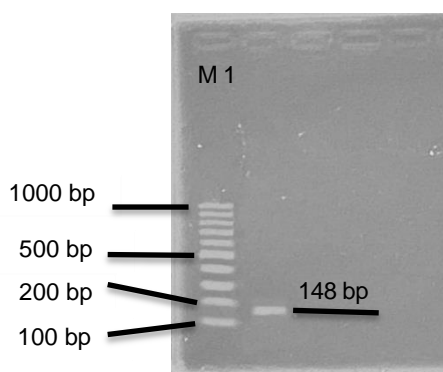
(A: triệu chứng héo xanh; B: mạch gỗ hóa nâu; C: dòng vi khuẩn tuôn từ mô mạch gỗ của dây nhiễm bệnh dưới kính hiển vi ở vật kính 10X; D: hình thái khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường King'B)

Dựa vào triệu chứng gây hại trên khoai lang và hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập được từ cây khoai lang bị bệnh héo xanh ở Vĩnh Long có sự tương đồng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh được mô tả bởi nhiều tác giả. Trên thế giới đã có nhiều công bố về nguyên nhân gây bệnh héo xanh trên khoai lang như của vùng lãnh thổ Đài Loan (Chen *et al.*, 2012) và Trung Quốc (Li *et al.*, 2021).

Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Seal *et al.* (1992) đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* là cặp mồi PS96-H/PS96-I. Vì thế, trong nghiên cứu này sẽ sử dụng cặp mồi đặc hiệu PS96-H/PS96-I nhằm xác định tác nhân gây bệnh có phải là vi khuẩn

R. solanacearum hay không, kết hợp với kiểm tra khả năng gây bệnh theo quy trình Koch, từ đó xác định chính xác tác nhân gây bệnh héo xanh trên khoai lang tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

Kết quả nhận diện vi khuẩn gây bệnh dựa trên kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu PS96H/PS96I cho vi khuẩn *R. solanacearum* cho thấy sản phẩm PCR được khuếch đại bằng cặp mồi PS96H/PS96I từ DNA của mẫu vi khuẩn gây héo rũ khoai lang hiển thị trên gel agarose 1,5% với băng DNA có kích thước khoảng 148 bp, đúng tương tự với miêu tả kết quả nghiên cứu của Seal *et al.* (1992) vi khuẩn gây héo xanh trên khoai lang tại Bình Tân, Vĩnh Long là vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (hình 3).



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi chuyên tính PS96-H/PS96-L cho vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên khoai lang (giếng M: 100bp DNA ladder; giếng 1: vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên khoai lang)

Tóm lại, dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, khả năng gây bệnh bằng quy trình Koch và định danh bằng cặp mồi đặc hiệu PS96H/PS96L, kết luận rằng vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên khoai lang được phân lập từ mẫu bệnh tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với ghi nhận về tác nhân gây bệnh héo xanh trên khoai lang như ở vùng lãnh thổ Đài Loan (Chen *et al.*, 2012) và Trung Quốc (Li *et al.*, 2021) là vi khuẩn *R. solanacearum*.

3.2. Kết quả đánh giá hiệu quả phòng trị bệnh héo xanh khoai lang do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* bằng các dòng thực khuẩn thể triển vọng

3.2.1. Tỷ lệ bệnh

Bảng 1. Ảnh hưởng của thực khuẩn thể đến mức độ bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên cây khoai lang trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Tỷ lệ bệnh (%)		Trung bình cấp bệnh		AUDPC
	18 NSKLB	38 NSKLB	18 NSKLB	38 NSKLB	
TKT Φ 1	40 ^b	55 ^b	0,70 ^b	1,55 ^b	875 ^c
TKT Φ 2	55 ^{ab}	75 ^b	1,05 ^{ab}	2,35 ^b	1200 ^{bc}
TKT Φ 4	35 ^b	80 ^{ab}	0,60 ^b	2,20 ^b	1325 ^b
Hỗn hợp TKT	40 ^b	60 ^b	0,95 ^{ab}	1,70 ^b	850 ^c
Oxolinc axit	70 ^{ab}	70 ^b	1,30 ^{ab}	2,35 ^b	1550 ^{ab}
Đối chứng	80 ^a	100 ^a	1,75 ^a	4,45 ^a	1900 ^a
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	24,14	15,22	37,86	17,33	16,17

Ghi chú: số liệu được chuyển sang $\arcsin \sqrt{x \pm \frac{1}{4n}}$ trước khi xử lý thống kê. Các số trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1% trong phép thử Duncan. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. NSKLB: ngày sau khi lây bệnh.

Qua bảng 1 cho thấy các nghiệm thức xử lý TKT đều cho tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt so với nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên nghiệm thức xử lý oxolinic axit có tỷ lệ bệnh không khác biệt với nghiệm thức đối chứng.

Ở thời điểm 18 NSKLB, ba nghiệm thức TKT Φ1, TKT Φ4 và hỗn hợp ba TKT (Φ1, Φ2, Φ4 với tỷ lệ 1:1:1) ở mật số 10^8 pfu/ml có tỷ lệ bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng nhưng không khác biệt ý nghĩa với TKT Φ2 và oxolinic axit.

Ở thời điểm 38 NSKLB, các TKT Φ1, Φ2, hỗn hợp TKT và thuốc oxolinic acid có tỉ lệ bệnh trong khoảng 55 - 75%, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng có TLB 100% (hình 4).

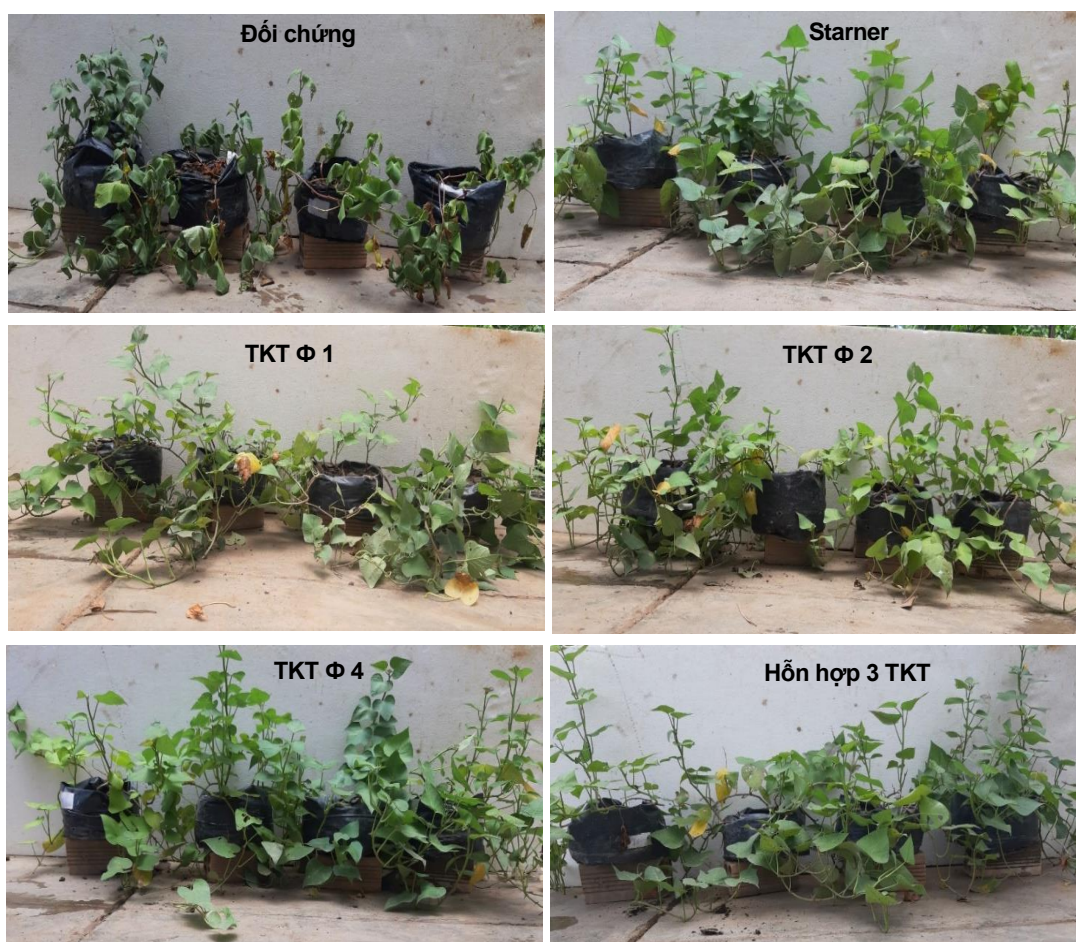
3.2.2. Trung bình cấp bệnh

Thời điểm 18 NSKLB, hai nghiệm thức TKT Φ1, TKT Φ4 biểu hiện bệnh ít hơn với trung bình cấp bệnh (TBCB) là 0,7 và 0,6 , thấp hơn khác biệt ý nghĩa so với đối chứng (1,75). Đến 38 NSKLB, cả 4 nghiệm thức xử lý TKT và thuốc oxolinic

acid đều thể hiện hiệu quả giảm bệnh thông qua cấp bệnh thấp và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (hình 4).

3.2.3. Về chỉ số tích lũy bệnh AUDPC

Cả bốn nghiệm thức xử lý TKT đều có giá trị AUDPC thấp hơn và khác biệt so với đối chứng, trong đó nghiệm thức TKT Φ1 và hỗn hợp TKT có chỉ số tích lũy bệnh AUDPC thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức xử lý Φ4. Nghiệm thức oxolinic acid không thể hiện sự khác biệt so với đối chứng.



Hình 4. Mức độ bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên khoai lang của các nghiệm thức ở thời điểm 38 NSKLB

Tóm lại, từ kết quả bảng 1 ghi nhận các nghiệm thức TKT Φ1 và hỗn hợp ba TKT (Φ1, Φ2, Φ4 với tỉ lệ 1:1:1) ở mật số 10^8 pfu/ml cho hiệu quả phòng trị bệnh héo xanh trên khoai lang tốt với tỉ lệ bệnh, cấp bệnh thấp hơn và khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng qua từng thời điểm ghi nhận. Thực vậy, theo Nguyễn Văn Phong (2021) cho thấy TKT Φ1 có đường kính phân giải lớn và ổn định so với các dòng TKT còn lại theo thời gian trong điều kiện phòng thí nghiệm. Chính vì vậy, TKT Φ1 có khả năng nhân mật số nhanh đã ngăn chặn và tiêu diệt vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* ngay từ ban đầu, nên làm giảm mật số vi khuẩn ngay từ ban đầu do vậy hạn chế được bệnh héo xanh. Như vậy, qua kết quả cho thấy TKT là một trong những tác nhân phòng trừ sinh học tiềm năng trong tự nhiên, đặc biệt phòng trị bệnh vi khuẩn có nguồn gốc từ đất. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận bởi Alvarez và Biosca (2017); Wei *et al.* (2017).

4. KẾT LUẬN

Kết quả xác định được tác nhân gây bệnh héo xanh khoai lang thu thập tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long là do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*. Bên cạnh đó nghiên cứu xác định được dòng thực khuẩn thể Φ1 và hỗn hợp ba TKT (Φ1, Φ2, Φ4 với tỉ lệ 1:1:1) ở mật số 10^8 pfu/ml xử lý vào đất với 10 ml/dây khoai lang cho khả năng phòng trị bệnh héo xanh khoai lang trong điều kiện nhà lưới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alvarez, B., and E. G. Biosca (2017). Bacteriophage - Based Bacterial Wilt

- Biocontrol for an Environmentally Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci.* 8:1218.
2. Ateka, E. M., Mwang'Ombe, A. W., and Kimenju, J. W. (2001). Reaction of potato cultivars to *Ralstonia solanacearum* in Kenya. *African Crop Science Journal*, 9(1): 251 - 256.
3. Chen, Y. J., Lin, Y. S. and Chung, W. H., (2012). Bacterial wilt of sweet potato caused by *Ralstonia solanacearum* in Taiwan. *Journal of General Plant Pathology*, 78(1): 80 - 84.
4. Đoàn Thị Kiều Tiên, Nguyễn Thị Thu Nga, Nguyễn Minh Tâm (2017). Phân lập và đánh giá khả năng phòng trị bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* trên dưa leo bằng thực khuẩn thể. *Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam*, lần thứ 16, Tr. 101 - 110.
5. Jiang, G., Wei Z., Xu J., Chen H., Zhang Y., She X., Macho A.P., Ding W. and Liao B. (2017). Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives. *Front Plant Sci.* 8: 1 - 10.
6. Jones, J. B., Iriarte, F., Obradovic, A., Balogh, B., Momol, M. T., and Jackson, L. E. (2006). Management of bacterial spot on tomatoes with bacteriophages. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft*, (408): 154 - 157.
7. Li, H., Zhang, H., Liu, Z., Lin, Z., Qiu, Y., Tang, H., & Qiu, S. (2021). Rapid diagnosis of *Ralstonia solanacearum* infection sweet potato in China by loop - mediated isothermal amplification. *Archives of Microbiology*, 203, 777 - 785.
8. Nagy, J., Király, L., and Schwarczinger, I. (2012). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Open Life Sciences*, 7(1): 1 - 12.
9. Nga NTT, Tran TN, Holtappels D, Kim Ngan NL, Hao NP, Vallino M, Tien DTK, Khanh - Pham NH, Lavigne R, Kamei K, Wagemans J, Jones JB. (2021). Phage Biocontrol of Bacterial Leaf Blight Disease on Welsh Onion Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Antibiotics* 10(5):517.

10. Nguyễn Thúy An, Phạm Văn Kim, Nguyễn Văn Minh Phụng và Nguyễn Thị Thu Nga (2017). Phân lập và tuyển chọn các dòng thực khuẩn thể trong phòng trừ bệnh héo xanh trên cây hoa vạn thọ (*Tagetes papula* L.) do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*: 44 - 52.
11. Nguyễn Văn Phong (2021). Phân lập và tuyển chọn thực khuẩn thể có khả năng phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith trên khoai lang. Luận văn đại học ngành Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ, 37 trang.
12. Seal, S. E., Jackson, L. A. and Daniels, M. J. (1992). Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3751 - 3758.
13. Shaner, G., & Finney, R. E. (1980). New sources of slow leaf rusting resistance in wheat. *Phytopathology*, 70(12), 1183 - 1186.
14. Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).
15. Tanaka, H., Negishi, H., and Maeda, H. (1990). Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Japanese Journal of Phytopathology*, 56(2): 243 - 246.
16. Wei, C., J. Liu, A. N. Maina, F. B. Mwaura, J. Yu, C. Yan, R. Zhang, and H. Wei. (2017). Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. *Virologica Sinica* 32(6):476 - 484.
17. Wommack, K.E., Colwell, R.R., (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 69 - 114.

ABSTRACT

Identification of causal agent of wilt disease on sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and prevention of the disease by bacteriophage in greenhouse conditions

*Bacterial wilt is the most important disease on sweet potatoes growing at Binh Tan district, Vinh Long province. The purpose of this research is identification of the agent causing wilt on sweet potatoes and evaluation on efficacy of bacteriophage in controlling the disease under greenhouse conditions. Identification of the agent causing bacterial wilt on sweet potatoes was conducted based on Koch postulates and PCR technique using specific primer PS96-H/PS96-I. The results showed that causal agent of the disease was *Ralstonia solanacearum*. Next, applying on bacteriophage for controlling bacterial wilt was carried out in greenhouse conditions. The experiment was followed by randomized complete design with six treatments (single phage $\Phi 1$, $\Phi 2$ and $\Phi 4$, mixture of three phages, oxolinic acid and control) and with four replications per each treatment. The results showed that all single phage or mixture phage treatments showed lower disease index, disease scale and AUDPC than the control. In which, the two treatments of phage $\Phi 1$ and mixture phage expressed better disease reduction.*

Keywords: bacterial wilt, sweet potatoes, bacteriophage, *Ralstonia solanacearum*.

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN VÙNG RỄ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN, NĂNG SUẤT VÀ TÌNH HÌNH BỆNH HẠI TRÊN CÂY LÚA TÍM (*Oryza sativa* L.) TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ MÀNG

Nguyễn Thị Hương Cẩm^{1*}, Tiên Huỳnh², Nguyễn Văn Nam¹

¹ Trường Đại học Tây Nguyên

² Trường Đại học RMIT

* E-mail liên hệ: nthcam@ttn.edu.vn

TÓM TẮT

Bốn chủng vi khuẩn được phân lập từ đất vùng rễ cây lúa tím trồng tại tỉnh Đắk Lắk sử dụng để đánh giá ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng, phát triển, năng suất và tình hình bệnh hại trên giống lúa tím VH1 trong điều kiện nhà màng. Thí nghiệm gồm 6 công thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), một yếu tố, ba lần nhắc lại. Kết quả ghi nhận, cả bốn chủng vi khuẩn nghiên cứu đã làm tăng khả năng tích lũy đạm, phospho trong lá cây lúa. Giai đoạn trổ bông, hàm lượng N% trong lá tăng khoảng 7,69 - 34,86%; hàm lượng P% trong lá tăng từ 16,67 - 45,45% so với công thức đối chứng. Sau 4 tháng chủng nhiễm vi khuẩn, sinh trưởng, phát triển của giống lúa VH1 ở những công thức có chủng các vi khuẩn này cũng tốt hơn: chiều cao cây tăng 13,39 - 20,40%; số nhánh tăng 46,34 - 81,82%; khối lượng cây tươi tăng 6,38 - 14,22%; chiều dài bông lúa tăng 14,74 - 20,41%; số bông/m² tăng 49,77 - 84,72%; số hạt/bông tăng 2,27 - 8,02%; tỉ lệ hạt chắc tăng 3,45 - 7,54% và khối lượng 1.000 hạt tăng 0,86 - 2,51%. Hơn thế nữa, cây lúa tím ở cả bốn công thức chủng vi khuẩn vùng rễ chống chịu tốt với bệnh hại. Do đó, năng suất của cây lúa tím thí nghiệm chủng nhiễm vi khuẩn đạt đến 95,46 tạ/ha, gấp từ 1,79 - 2,16 lần so với ở các công thức đối chứng. Kết quả cho thấy, vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41 và *Enterobacter* sp. RDLN105 là hai chủng vi khuẩn vùng rễ tiềm năng có thể xem xét sử dụng trong việc nghiên cứu sản xuất phân sinh học ứng dụng trong canh tác lúa bền vững.

Từ khóa: lúa tím, nhà màng, vi khuẩn vùng rễ, *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41 và *Enterobacter* sp. RDLN105.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng ở thực vật (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR) là hệ vi khuẩn cư

trú trong đất xung quanh hoặc trên bề mặt rễ cây trồng. Thông qua việc xâm chiếm rễ cây ký chủ, vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (Spaepen, 2009; Kumar và cs., 2019; Singh và cs., 2023) và gia tăng đối kháng với các tác nhân gây

Người phân biên: TS. Đỗ Thị Kiều An

bệnh xung quanh vùng rễ cây trồng bằng cách gián tiếp ức chế mầm bệnh nhờ kháng sinh, enzyme phân hủy vách tế bào hoặc có thể cạnh tranh dinh dưỡng và nơi cư trú với mầm bệnh (Siddiqui, 2006; Khan và cs., 2008; Lugtenberg và Kamilova, 2009; Anand và cs., 2016; Kumari và cs., 2019). Chính vì vậy, vi khuẩn vùng rễ đang là đối tượng được rất nhiều nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu để ứng dụng trong canh tác cây trồng bền vững.

Lúa tím (*Oryza sativa* L.) là một trong những loại trồng quý hiếm ở khu vực châu Á (Pusadee và cs., 2019), đặc trưng bởi sắc tố tím trong lớp vỏ (Abdel-Aal El và cs., 2006; Das và cs., 2014). Lúa tím được đánh giá là loại lương thực có giá trị dinh dưỡng và giá trị dược liệu cao. Đó là bởi trong lúa tím có chứa các axit amin thiết yếu, lipid, chất xơ, vitamin, canxi, kẽm, sắt, omega, anthocyanin, phenolic, γ -oryzanol... (Das và cs., 2014; Sirirat và cs., 2018; Callcott và cs., 2019; Veeradittakit và cs., 2021; Yamuangmorn và Prom-U- Thai, 2021). Do đó, lúa tím đang dần được nhiều người quan tâm và sử dụng làm thực phẩm thương mại, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm.

Trong những năm qua, nhiều tiến bộ khoa học kỹ thuật đã được áp dụng trong sản xuất nhằm tăng năng suất và chất lượng lúa gạo. Tuy nhiên, ngành sản xuất lúa gạo Việt Nam hiện vẫn đang phải đối mặt với nhiều vấn đề như: giá thành sản xuất cao, bùng nổ dịch bệnh, chất lượng lúa gạo giảm và thoái hóa đất canh tác... Nguyên nhân chính là do việc người sản xuất lạm dụng phân hóa học và thuốc bảo vệ thực vật (Phạm Quang Hà và Nguyễn Văn Bộ, 2013; Hoàng Thị Trang, 2018; Lê

Thanh Phong và Trần Anh Thông, 2020). Việc cần tìm kiếm giải pháp mới thân thiện hơn với môi trường đồng thời vẫn đảm bảo khả năng sinh trưởng, phát triển và chống chịu bệnh hại của cây lúa là vô cùng quan trọng.

Một số kết quả nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam cho thấy, nhiều loài vi khuẩn vùng rễ cây lúa được biết đến có khả năng trực tiếp hoặc gián tiếp thúc đẩy tăng trưởng thực vật, tăng cường khả năng chống chịu bệnh hại (Cao Ngọc Diệp, 2005; Nguyễn Đức Diên và cs., 2017; Khan và cs., 2017; Nguyễn Thu Hương và cs., 2018; Saengsanga, 2018; Ding và cs., 2019). Tuy nhiên, hiện nay những nghiên cứu về tác động của các chủng vi khuẩn vùng rễ đến sự sinh trưởng phát triển, năng suất cây lúa tím còn khá hạn chế, đặc biệt là ở Việt Nam.

Trước những thực trạng trên, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn vùng rễ đến sinh trưởng, phát triển, năng suất và tình hình bệnh hại ở cây lúa tím nhằm xác định chủng vi khuẩn phù hợp cho cây trong điều kiện nhà màng làm cơ sở có thể xem xét ứng dụng trong canh tác lúa bền vững.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Nguồn vi khuẩn vùng rễ: 4 chủng vi khuẩn vùng rễ có hoạt tính cố định đạm, phân giải photphate khó tan, sinh tổng hợp IAA tốt được tuyển chọn từ kết quả phân lập tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ cây lúa tím trồng tại Đắc Lắc theo phương

pháp của Souza và cs. (2013), Saengsanga (2018), Olsen và Sommer (1982), Page và cs. (1982), Saengsanga (2018), gồm: *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41; *Pseudomonas aeruginosa* RDLN43; *Enterobacter* sp. RDLN105 và *Serratia marcescens* RDLN186.

- Giống lúa tím VH1 (hay còn gọi là Vĩnh Hòa 1): là giống lúa được bảo hộ bởi Văn phòng Bảo hộ giống cây trồng mới, Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, số bằng 26.VN.2014 và chủ sở hữu là Công ty TNHH Khoa học Công nghệ Vĩnh Hòa). Đặc điểm: hạt lúa màu tím, thân cây mập, chắc, cứng, không đổ ngã, bộ lá khỏe, đẻ nhánh khỏe; trổ bông tập trung, thoát bông, bông to, số bông/m² và tỉ lệ hạt chắc cao; hạt có mùi thơm nhẹ, cơm dẻo và ngon; năng suất từ 55,00 - 100,00 tạ/ha; giống chịu thâm canh, kháng trung bình với bệnh bạc lá, đạo ôn, đốm nâu, khô vằn; giống dài ngày, thích hợp với điều kiện khí hậu và đất đai của nhiều địa phương trong cả nước, trồng được 2 vụ trong năm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 01/2022 - 7/2022.

- Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Ứng dụng và Tư vấn kỹ thuật, Khoa Nông Lâm nghiệp, Trường Đại học Tây Nguyên, tỉnh Đắk Lắk.

- Phương pháp thí nghiệm:

+ Thí nghiệm bố trí trong nhà màng thiết kế theo mô đun 28,0 m × 18,0 m = 504,0 m² được gia công lắp đặt, dựng từ hệ thống khung, vòm bằng kết cấu ống thép mạ kẽm; mái lợp plastic; xung quanh xây tường chống chuột, rấn và lưới nhựa chống côn trùng.

+ Chuẩn bị đất trồng: đất được thu ở vùng trồng lúa tại huyện Ea Súp, tỉnh Đắk Lắk ở độ sâu 0 - 20 cm, được phơi khô, sàng kỹ, cho vào mỗi chậu khoảng 8 kg đất (kích thước chậu khoảng 30 × 45 cm). Sau đó, ngâm nước cho mềm, tạo lớp đất nhuyễn trên mặt chậu. Trước khi cấy khoảng 2 ngày, bón lót cho đất chậu. Đất trồng có pH_{KCl} 4,18; Nts 0,04%; P₂O₅dt 6,75 mg/100 g đất; K₂Odt 3,49 mg/100 g đất; Ca⁺⁺ 6,10 đl/100 g đất và Mg⁺⁺ 3,22 đl/100 g đất.

+ Chuẩn bị dịch vi khuẩn: 4 chủng vi khuẩn vùng rễ chọn lọc, được nhân nuôi trên môi trường NB lỏng, ủ trong máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong 1 - 2 ngày (Saengsanga, 2018). Điều chỉnh mật số tế bào đạt 10⁹ CFU/ml dịch. Kết quả thu được coi là dịch huyền phù vi khuẩn tiêu chuẩn và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 4°C để sử dụng.

+ Chuẩn bị hạt giống: hạt lúa giống được khử trùng bằng cách ngâm trong Etanol 90% trong 3 phút, rồi ngâm trong Natri hypoclorit 3,5% trong 30 phút và rửa lại 3 - 4 lần bằng nước cất vô trùng. Hạt lúa tiệt trùng tiếp tục được ngâm (1) trong huyền phù vi khuẩn hoặc (2) trong nước cất vô trùng hoặc (3) dịch môi trường dùng để nhân nuôi chủng vi khuẩn trong 1 giờ. Hạt lúa giống thu được cho lên giấy ẩm trong đĩa peptri đặt trong bóng tối. Sau khi hạt nảy mầm, hạt được gieo mạ và chăm sóc mạ trong thời gian 21 ngày (Saengsanga, 2018).

+ Cách cấy: sau 21 ngày, mạ được nhổ và ngâm vào dịch vi khuẩn (tùy theo công thức) trong 15 phút (Purwanto và cs., 2021), sau đó cấy vào chậu với khoảng cách 15 × 10 cm.

+ Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 6 công thức với 3 lần nhắc lại. Mỗi lần nhắc lại của một công thức gồm: 3 chậu x 9 cây/chậu = 27 cây. Vậy tổng số cây cần cho thí nghiệm: 27 cây x 3 lần nhắc lại x 6 công thức = 486 cây, tương ứng với 54 chậu

Các công thức thí nghiệm gồm: CT1: nước cất vô trùng (ĐC1), CT2: dịch môi trường NB (ĐC2), CT3: vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* RDLB41; CT4: vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* RDLN43; CT5: vi khuẩn *Enterobacter* sp. RDLN105 và CT6: vi khuẩn *Serratia marcescens* RDLN186.

+ Chăm sóc thí nghiệm theo Quy trình Kỹ thuật trồng lúa thảo dược Vĩnh Hòa 1 (Nguyễn Thị Minh Huyền, 2017a). Phân bón cho 1 ha: 85 kg N + 70 kg P₂O₅ + 110 kg K₂O. Đất được giữ ẩm trong giai đoạn 0 - 3 ngày sau khi gieo, sau đó tưới nước và duy trì mức nước từ 2 - 10 cm (tùy giai đoạn cây lúa).

+ Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi: áp dụng theo Quy chuẩn Kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng của giống lúa số QCVN 01 - 55: 2011/BNN&PTNT năm 2011 (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2011). Các chỉ tiêu gồm:

Ở giai đoạn trổ bông, hàm lượng đạm tổng số trong lá (% chất khô trong lá): được xác định theo tiêu chuẩn 10TCN 451:2001 (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2001a); hàm lượng lân tổng số trong lá (% chất khô trong lá): được xác định theo tiêu chuẩn 10TCN

453:2001 (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2001b).

Chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển: chiều cao cây (cm): đo từ mặt đất đến đỉnh sinh trưởng của cây (giai đoạn chín: đo từ mặt đất đến đỉnh bông cao nhất, không kể râu hạt); số nhánh (nhánh): đếm số nhánh trên cây (nhánh dài trên 2 cm); khối lượng cây tươi (g): nhỏ, rửa sạch, để ráo và cân toàn bộ khối lượng cây tươi kể cả rễ cây; chiều dài bông lúa (cm): đo từ gốc bông đến đỉnh bông (không kể râu hạt) ở giai đoạn chín; số bông hữu hiệu (bông): đếm số bông có ít nhất 10 hạt chắc của một cây ở giai đoạn chín.

Chỉ tiêu bệnh hại: bệnh đạo ôn hại lá: quan sát vết bệnh gây hại trên lá và đánh giá theo thang điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9; bệnh đạo ôn cổ bông: quan sát vết bệnh gây hại xung quanh cổ bông và đánh giá theo thang điểm 0, 1, 3, 5, 7, 9; bệnh khô vằn: quan sát độ cao tương đối của vết bệnh trên lá hoặc bẹ lá và đánh giá theo thang điểm 0, 1, 3, 5, 7, 9; bệnh đốm nâu: quan sát diện tích vết bệnh trên lá và đánh giá theo thang điểm 0, 1, 3, 5, 7, 9; bệnh bạc lá: quan sát vết bệnh trên lá và đánh giá theo thang điểm 0, 1, 3, 5, 7, 9.

Chỉ tiêu cấu thành năng suất và năng suất: số bông/m²: đếm tất cả số bông trên 1 m²; số hạt/bông (hạt): đếm tổng số hạt có trên bông ở giai đoạn chín; tỉ lệ chắc/bông (%): tính tỉ lệ (%) hạt chắc trên bông ở giai đoạn chín; khối lượng 1.000 hạt (g): cân 8 mẫu 100 hạt ở độ ẩm 14% tại giai đoạn chín (đơn vị tính g, lấy một chữ số sau dấu phẩy); năng suất lý thuyết (tạ/ha) = Số bông/m² × Số hạt/bông × Tỷ lệ hạt chắc × Khối lượng 1.000 hạt (g) × 10⁻⁴.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Excel và SAS 9.1, sử dụng trắc nghiệm phân hạng LSD (Least significant difference) ở mức ý nghĩa $\alpha \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đến hàm lượng dưỡng chất tích lũy trong lá của cây lúa tím

Bốn chủng vi khuẩn vùng rễ sau khi chủng nhiễm vào cây đã có những ảnh hưởng tích cực đến sự tích lũy các dưỡng chất đa lượng thiết yếu trong lá lúa tím trong điều kiện nhà màng. Kết quả phân tích N% và P% trong lá lúa tím VH1 giai đoạn trổ bông cho thấy, N% và P% trong lá lúa ở bốn công thức đều cao hơn so với ở công thức đối chứng, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$) (bảng 1).

Hàm lượng đạm tổng số trong lá cây lúa tím VH1 giai đoạn trổ bông dưới sự tác động của bốn chủng vi khuẩn vùng rễ biến động từ 1,96 - 2,36%. Đáng chú ý hơn cả là cây lúa tím ở công thức CT3 chủng dịch

vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* RDLB41 có khả năng tích lũy đạm tổng số cao nhất, cao hơn gấp 1,09 - 1,20 lần so với các công thức chủng vi khuẩn khác. Ngược lại, hàm lượng đạm tổng số tích lũy ở lá lúa ở hai công thức đối chứng ĐC1 (xử lý nước cất) và ĐC2 (xử lý môi trường dinh dưỡng NB) chỉ đạt từ 1,75 - 1,82% và thấp hơn gấp 1,30 - 1,35 lần so với công thức chủng dịch vi khuẩn.

Các chủng vi khuẩn vùng rễ cũng ảnh hưởng tích cực đến sự tích lũy lân trong lá lúa tím giai đoạn trổ bông. Hàm lượng lân tổng số trong lá lúa dưới sự tác động của các chủng vi khuẩn vùng rễ biến động từ 0,14 - 0,16%. Nổi bật nhất tiếp tục là công thức CT3 (chủng *Stenotrophomonas maltophilia* RDLB41), cao hơn đến 1,14 lần so với các công thức chủng dịch vi khuẩn thí nghiệm còn lại và cao hơn đến 1,4 lần so với các công thức đối chứng. Công thức CT6 (chủng dịch vi khuẩn *Serratia marcescens* RDLN186) có hàm lượng lân tổng số thấp nhất trong các công thức chủng vi khuẩn (chỉ đạt 0,14%), nhưng vẫn cao hơn so với các công thức đối chứng đến 1,27 lần.

Bảng 1. Ảnh hưởng của vi khuẩn vùng rễ đến hàm lượng đạm, lân tích lũy trong lá giống lúa tím VH1 giai đoạn trổ bông trong điều kiện nhà màng

Công thức	Chủng vi khuẩn	N (% chất khô)	P (% chất khô)
CT1	ĐC1 (nước cất)	1,75 ^d	0,11 ^e
CT2	ĐC2 (môi trường NB)	1,82 ^{cd}	0,12 ^d
CT3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> RDLB41	2,36 ^a	0,16 ^a
CT4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RDLN43	2,16 ^b	0,15 ^b
CT5	<i>Enterobacter</i> sp. RDLN105	2,17 ^b	0,15 ^b
CT6	<i>Serratia marcescens</i> RDLN186	1,96 ^c	0,14 ^c
	<i>F-test</i>	*	*
	<i>CV (%)</i>	4,07	2,67

Ghi chú: các giá trị trung bình (theo cột) theo sau bởi cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha \leq 0,05$.

3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đến sự sinh trưởng, phát triển của cây lúa tím

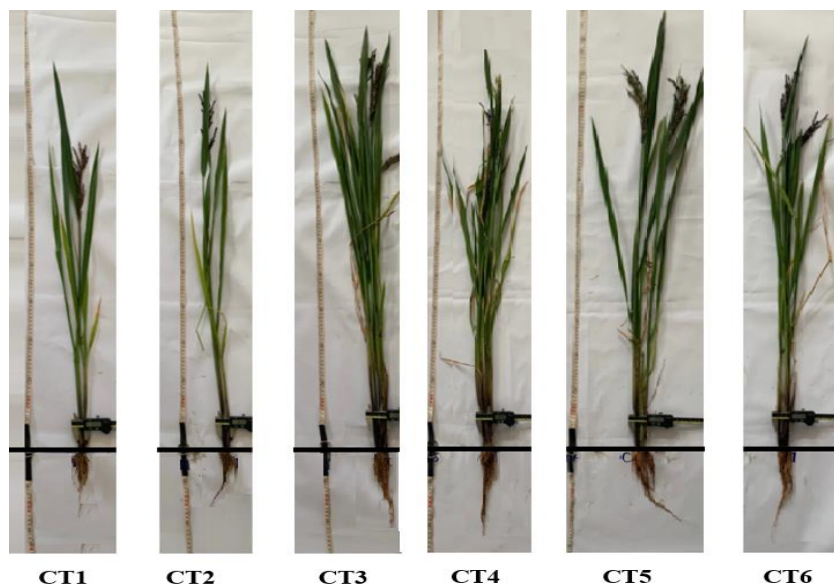
Đậm và lân tích lũy trong lá tăng là tiền đề thúc đẩy quá trình hấp thu dinh

dưỡng của cây lúa diễn ra thuận lợi và tác động tích cực đến sinh trưởng, phát triển của cây lúa tím (bảng 2 và hình 1).

Bảng 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn vùng rễ đến một số đặc điểm hình thái cây của giống lúa tím VH1 trong điều kiện nhà màng

Công thức	Chủng vi khuẩn	Chiều cao cây (cm)	Số nhánh/cây	Khối lượng cây tươi (g)
CT1	ĐC1 (nước cất)	100,40 ^d	2,53 ^d	208,00 ^c
CT2	ĐC2 (môi trường NB)	104,18 ^c	2,87 ^c	221,17 ^b
CT3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> RDLB41	120,88 ^a	4,60 ^a	237,03 ^a
CT4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RDLN43	118,98 ^{ab}	4,60 ^a	236,83 ^a
CT5	<i>Enterobacter</i> sp. RDLN105	119,20 ^{ab}	4,53 ^a	237,57 ^a
CT6	<i>Serratia marcescens</i> RDLN186	118,13 ^b	4,20 ^b	235,27 ^a
	<i>F- est</i>	*	*	*
	CV (%)	2,10	4,37	6,62

Ghi chú: các giá trị trung bình (theo cột) theo sau bởi cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha \leq 0,05$.



Hình 1. Hình thái cây lúa tím ở thời điểm 4 tháng sau xử lý

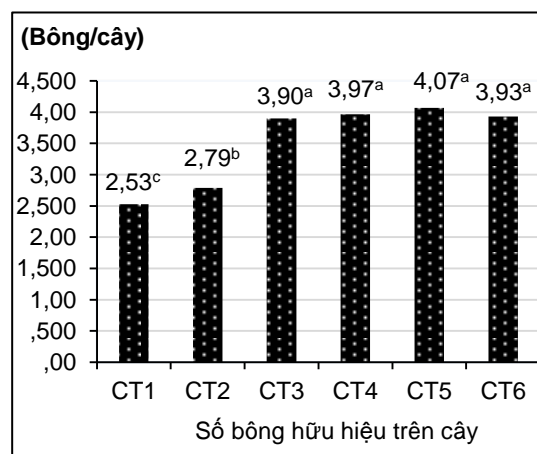
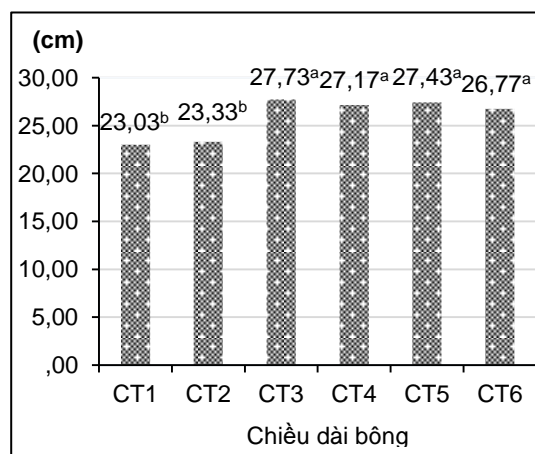
(CT1: ĐC1 (nước cất); CT2: ĐC2 (môi trường NB); CT3: vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41; CT4: vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* RDLN43; CT5: vi khuẩn *Enterobacter* sp. RDLN105; CT6: vi khuẩn *Serratia marcescens* RDLN186)

Chỉ tiêu liên quan hình thái cây của giống lúa tím VH1 ở các công thức được chủng vi khuẩn vùng rễ đều cao hơn so với các công thức đối chứng không chủng vi khuẩn vùng rễ, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$). Ở công thức có chủng vi khuẩn vùng rễ, chiều cao cây tăng 13,39 - 20,40%; số nhánh tăng 46,34 - 81,82% và khối lượng cây tươi tăng 6,38 - 14,22% so với hai đối chứng ĐC1 và ĐC2. Đáng chú ý, hầu hết chỉ tiêu sinh trưởng cây lúa tím ở công thức được chủng vi khuẩn vùng rễ *S. maltophilia* RDL1B41 (CT3) đều cao hơn so với các công thức thí nghiệm còn lại.

Khi lúa chín, các công thức thí nghiệm chủng vi khuẩn có chiều dài bông lúa từ 26,77 - 27,73 cm (biểu đồ 1). Cây lúa tím có chiều dài bông lớn nhất là ở công thức chủng *S. maltophilia* RDL1B41

(CT3), kế đến là công thức CT5 chủng nhiễm vi khuẩn *Enterobacter* sp. RDLN105. Trong khi đó, chiều dài bông lúa ở hai công thức đối chứng chỉ đạt đến 23,33 cm, thấp hơn các công thức chủng dịch vi khuẩn từ 12,85 - 16,95%. So sánh chiều dài bông của cây lúa tím VH1 trong nghiên cứu với cây lúa tím VH1 không chủng vi khuẩn vùng rễ trồng tại tỉnh Đắk Lắk của Nguyễn Thị Minh Huyền (2017b) cho thấy, chiều dài bông lúa ở công thức chủng vi khuẩn vùng rễ nghiên cứu đều dài hơn từ 2,77 - 3,73 cm.

Về số bông hữu hiệu, cây lúa tím ở công thức CT5 (chủng *Enterobacter* sp. RDLN105) có số lượng bông lớn nhất, đạt 4,07 bông/cây; cao hơn gấp đến 1,04 lần so với các công thức xử lý vi khuẩn và đến 1,61 lần so với các công thức đối chứng (CT1 và CT2).



Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của vi khuẩn vùng rễ đến một số đặc điểm bông của giống lúa tím VH1 trong điều kiện nhà màng

(CT1: ĐC1 (nước cất); CT2: ĐC2 (môi trường NB); CT3: vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41; CT4: vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* RDLN43; CT5: vi khuẩn *Enterobacter* sp. RDLN105; CT6: vi khuẩn *Serratia marcescens* RDLN186.

Các giá trị trung bình theo sau bởi cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha \leq 0,05$)

3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đến tình hình bệnh hại của cây lúa tím

Qua bảng 3 cho thấy, trong thời điểm thí nghiệm, trên cây lúa tím VH1 xuất hiện ba loại bệnh hại chính là bệnh đạo ôn hại lá, bệnh khô vằn và bệnh bạc lá, lần lượt dao động ở mức điểm 0 - 1, 0 - 3 và 0

- 3. Nghiên cứu cũng cho thấy, cây lúa tím VH1 được chủng vi khuẩn vùng rẫy chọn lọc cho khả năng kháng bệnh hại cao, mức độ gây hại chỉ ở mức điểm từ 0 - 1. Đáng chú ý, cây lúa tím được chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* RDLB41 và *Enterobacter* sp. RDLN105 hầu như không có bệnh xuất hiện.

Bảng 3. Ảnh hưởng của vi khuẩn vùng rẫy đến tình hình bệnh hại trên giống lúa tím VH1 trong điều kiện nhà màng

Công thức	Bệnh đạo ôn hại lá	Bệnh đạo ôn cổ bông	Bệnh khô vằn	Bệnh đốm nâu	Bệnh bạc lá
CT1	1	0	3	0	3
CT2	0 - 1	0	1 - 3	0	1 - 3
CT3	0	0	0	0	0
CT4	0	0	1	0	1
CT5	0	0	0 - 1	0	0
CT6	0 - 1	0	0 - 1	0	1

3.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đến một số yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của cây lúa tím

Việc xử lý vi khuẩn vùng rẫy ở giống lúa tím VH1 đã ảnh hưởng tích cực đến một số yếu tố cấu thành năng suất và năng suất cây lúa tím trong nhà màng (bảng 4).

Các chủng vi khuẩn vùng rẫy đã làm tăng số bông/m² trên cây lúa tím VH1 so với ở công thức đối chứng một cách có ý nghĩa ở mức $\alpha \leq 0,05$. Số bông/m² ở bốn công thức xử lý vi khuẩn dao động từ 271,91 - 292,47 bông, trong khi ở các công thức đối chứng chỉ đạt 1,58,33 - 181,56 bông/m².

Bảng 4. Ảnh hưởng của vi khuẩn vùng rẫy đến một số yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của giống lúa tím VH1 trong điều kiện nhà màng

Công thức	Số bông/m ²	Số hạt/bông	Tỉ lệ chắc (%)	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Năng suất (tạ/ha)
CT1	158,33 ^d	141,33 ^d	84,00 ^b	23,51 ^b	44,28 ^c
CT2	181,56 ^c	144,00 ^{cd}	86,35 ^{ab}	23,63 ^{ab}	53,47 ^b
CT3	292,11 ^a	150,67 ^{ab}	90,00 ^a	24,10 ^a	95,46 ^a
CT4	292,47 ^a	147,27 ^{bc}	89,33 ^a	24,00 ^{ab}	92,37 ^a
CT5	290,67 ^a	151,33 ^{ab}	89,72 ^a	23,83 ^{ab}	94,05 ^a
CT6	271,91 ^b	152,67 ^a	90,33 ^a	23,93 ^{ab}	89,76 ^a
<i>F-test</i>	*	*	*	*	*
<i>CV (%)</i>	3,20	6,87	2,30	4,11	5,23

Ghi chú: trên cùng một cột các chữ cái giống nhau theo sau giá trị trung bình khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $\alpha \leq 0,05$.

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy, vi khuẩn vùng rễ đã làm tăng số hạt/bông, tỉ lệ hạt chắc và khối lượng 1.000 hạt của giống lúa tím đến 8,02%; 7,54% và 2,51% so với ở hai công thức đối chứng, một cách tương ứng.

Vì các vi khuẩn vùng rễ đã kích thích sự sinh trưởng, phát triển của cây lúa tím trong điều kiện nhà màng nên năng suất đạt từ 89,76 tạ/ha ở công thức CT6 đến 95,46 tạ/ha ở công thức CT3; cao gấp từ 1,68 - 2,16 lần so với các công thức đối chứng thí nghiệm và sự sai khác giữa các công thức có ý nghĩa thống kê. Như vậy, giống lúa tím VH1 trong điều kiện nghiên cứu chủng nhiễm vi khuẩn vùng rễ đã đạt được mức tiềm năng năng suất giống khuyến cáo của nhà sản xuất giống (55,00 - 100,00 tạ/ha) và cao hơn đến 27,23 - 39,39 tạ/ha so năng suất giống lúa tím VH1 được trồng tại tỉnh Quảng Ngãi của Trương Thị Hùng Cường và cs. (2017).

4. KẾT LUẬN

Đánh giá bốn chủng vi khuẩn vùng rễ cho thấy, chủng *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41 và *Enterobacter* sp. RDLN105 đã có ảnh hưởng tích cực, làm tăng hàm lượng đạm và lân tổng số tích lũy trong lá cây lúa tím VH1 trồng trong điều kiện nhà màng. Chính vì vậy, cây lúa tím VH1 ở công thức được chủng hai vi khuẩn vùng rễ này sẽ được kích thích sinh trưởng và phát triển, tăng chiều cao cây, số lá, khối lượng cây tươi, chiều dài bông lúa, số bông/m², số hạt/bông, tỉ lệ hạt chắc, khối lượng 1.000 hạt và năng suất của cây so với công thức đối chứng. Hơn thế nữa, khả năng chống chịu sâu bệnh ở hai công thức này khá tốt. Kết quả này có thể mở ra tiềm

năng trong việc xem xét sử dụng chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41 và *Enterobacter* sp. RDLN105 để ứng dụng trong nghiên cứu canh tác lúa bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2001a). Tiêu chuẩn ngành 10TCN 451 - 2001: Phân tích cây trồng - Phương pháp phân tích nitơ tổng số. Hà Nội.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2001b). Tiêu chuẩn ngành 10TCN 453 - 2001: Phân tích cây trồng - Phương pháp phân tích photpho tổng số. Hà Nội.
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2011). Quy chuẩn Kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng của giống lúa số QCVN 01 - 55: 2011/BNN&PTNT. Hà Nội.
4. Trương Thị Hùng Cường, Trần Thị Lệ, Huỳnh Thị Thu Thủy (2017). Kết quả nghiên cứu nghiên cứu một số giống lúa thuần mới trung ngày tại tỉnh Quảng Ngãi. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tháng 12/2017, 34 - 39.
5. Nguyễn Đức Diệm, Nguyễn Lê Ái Vinh, Nguyễn Đình San, Võ Hành (2017). Ảnh hưởng của dịch nuôi chủng vi khuẩn lam *Nostoc calcicola* HN9-1a đến sinh trưởng và năng suất giống lúa Tám thơm thử nghiệm ở huyện Hưng Nguyên, tỉnh Nghệ An. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Vinh, 46(3A), 13 - 19.
6. Cao Ngọc Diệp (2005). Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn nốt rễ và vi khuẩn *Pseudomonas* spp. trên lúa cao sản trồng trên đất phù sa Cần Thơ. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 3, 1 - 7.
7. Phạm Quang Hà, Nguyễn Văn Bộ (2013). Sử dụng phân bón trong mối quan hệ với sản xuất lương thực, bảo vệ môi trường và giảm phát thải khí nhà kính. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 3.
8. Nguyễn Thị Minh Huyền (2017a). Quy trình kỹ thuật trồng lúa thảo dược Vĩnh Hòa 1. Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đắk Lắk, 3, 1 - 11.

9. Nguyễn Thị Minh Huyền (2017b). Kết quả Xây dựng mô hình trồng giống lúa thảo dược VH1 tại huyện Krông Bông, tỉnh Đắk Lắk. Thông tin Khoa học và Công nghệ, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Đắk Lắk, 5, 17 - 22.
10. Nguyễn Thu Hương, Trần Thị Thúy Hà, Nguyễn Văn Giang (2018). “Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan từ đất vùng rễ lúa ở tỉnh Hải Dương”, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 60 (8), 18 - 22.
11. Lê Thanh Phong, Trần Anh Thông (2020). Báo cáo Tổng quan về thuốc bảo vệ thực vật độc hại ở Việt Nam. TP. Hồ Chí Minh.
12. Hoàng Thị Trang (2018). Nghiên cứu đánh giá hiện trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật và phân bón hóa học trong sản xuất nông nghiệp ở xã Tân Long, huyện Tân Kỳ, tỉnh Nghệ An. Đại học Lâm nghiệp. Hà Nội.
13. Abdel-Aal El, S. M., Young, J. C., Rabalski, I. (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. Journal Agric Food Chem, 54(13), 4696 - 4704.
14. Anand, K., Kumari, B., Mallick, M. (2016). Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 8, 37 - 40.
15. Callcott, E. T., Blanchard, C. L., Snell, P., Santhakumar, A. B. (2019). The anti - inflammatory and antioxidant effects of pigmented rice consumption in an obese cohort. Food Funct, 10(12), 8016 - 8025.
16. Das, K. R., Medhabati, K., Nongalleima, K., Devi, H. S. (2014). The Potential of Dark Purple Scented Rice - From staple food to nutraceutical. Current World Environment, 9(3), 867 - 876.
17. Ding, L. J., Cui, H., Nie, S., Long, X. E., Duan, G. L. (2019). "Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere", FEMS Microbiology Ecology, 95, fiz040.
18. Khan, Z., Kim, S. G., Jeon, Y. H., Khan, H. U., Son, S. H. Kim, Y. H. (2008). "A plant growth promoting rhizobacterium. Paenibacillus polymyxa strain GBR - 1 ", Bioresource Technology, 99, 3.016 - 3.023.
19. Khan, M. M. A., Haque, E., Paul, N. C., Khaleque, M. A., Al - Garni, S. M. S., Rahman, M., Islam, M. T. (2017). Enhancement of Growth and Grain Yield of Rice in Nutrient Deficient Soils by Rice Probiotic Bacteria. Rice Science, 24(5), 264 - 273.
20. Kumari, B., Mallick, M. A., Solanki, M. K., Solanki, A. C., Hora, A., Guo, W. (2019), Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Modern Prospects for Sustainable Agriculture, Springer Nature Singapore Pte Ltd.
21. Kumar, A., Kumari, M., Swarupa, P., and Shireen, S. (2019). "Characterization of pH dependent growth response of agriculturally important microbes for development of plant growth promoting bacterial consortium", Journal of Pure and Applied Microbiology, 2, 1053 - 1062.
22. Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). "Plant - growth - promoting rhizobacteria", Annual Review of Microbiology, 63, 541 - 556.
23. Olsen, S. R., Sommer L. E. (1982). Phosphorus. Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd edition, Agron. Mongr. 9. ASA and SSSA, Madison WI, 403 - 430.
24. Page, A. L., Miller, R. H., Keeney, R. D (1982). Methods of soil analysis, Part 2: Chemical and microbiological properties, 2nd edition, American Society of Agronomy Incorporation. USA.
25. Pusadee, T., Wongtamee, A., Rerkasem, B., Olsen, K., Jamjod, S. (2019). Farmers Drive Genetic Diversity of Thai Purple Rice (*Oryza sativa* L.) Landraces. Economic Botany, XX(X), 1 - 10.
26. Purwanto, Widiatmoko, T., Widjonarko, B. R, (2021). "Net assimilation rate, growth and yield of rice (*Oryza sativa* L cv Inpago Unsoed 1) with the application of PGPR in different rate of nitrogen", IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 653.
27. Saengsanga, T. (2018). Isolation and Characterization of Indigenous Plant Growth - Promoting Rhizobacteria and Their Effects on Growth at the Early Stage of Thai Jasmine Rice (*Oryza sativa* L. KDML105). Arabian Journal for Science and Engineering, 43(7), 3.359 - 3.369.

28. Siddiqui, Z. A. (2006). PGPR: biocontrol and biofertilization, The Netherlands: Springer.
29. Singh, A., Yadav, V. K., Chundawat, R. S., Soltane, R., Awwad, N. S., Ibrahim, H. A.,... & Vicas, S. I. (2023). "Enhancing plant growth promoting rhizobacterial activities through consortium exposure: A review", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1099999.
30. Sirirat, D., Vjitra, L. I., Supaporn, C. (2018). "Characteristics of Thai Pigmented Rice Milk Kefirs with Potential as Antioxidant and Anti - Inflammatory Foods", *Pharmacognosy Journal*, 10 (1), 154 - 61.
31. Souza, R. D., Beneduzi, A., Ambrosini, A., da Costa, P. B., Meyer, J., Vargas, L. K., Passaglia, L. M. P. (2013). The effect of plant growth - promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and Soil*, 366(1), 585 - 603.
32. Spaepen, Stijn, Vanderleyden, Okon J., Yaacov (2009). "Plant growth - promoting actions of rhizobacteria", in Loon, L. C. Van, Editor, *Advances in Botanical Research*, Academic Press, 283 - 320.
33. Veeradittakit, J., Jumrus, S., Sringarm, K., Prom-u-thai, C. (2021). Improving nutritional values in purple rice through germination and parboiling processes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2), e14979.
34. Yamuangmorn, S., Prom-u-Thai, C. (2021). The Potential of High - Anthocyanin Purple Rice as a Functional Ingredient in Human Health. *Antioxidants*, 10(6).

ABSTRACT

Effects of rhizobacteria on the growth, development, yield and diseases of purple rice (*Oryza sativa* L.) Cultivated under plastic - house conditions

*Four rhizobacteria were isolated from rice rhizosphere soil of purple rice grown in Dak Lak province. These materials were used to test their affection on the growth, development, yield and diseases of VHI purple rice variety under plastic - house conditions. The experiments were conducted in a complete randomized design (CRD) with 3 replications of 6 formulas, one factor. The results showed that two strains increased nitrogen and phosphorus in rice leaves. At the flowering stage, the content of nitrogen enhanced from 7.69 to 34.86%, and phosphorous content increased from 16,67 to 45,45% compared to the control. At the time of 4 months of experiment, these rhizobacteria stimulated strongly the growth and development of VHI purple rice variety in the formulas such as: there was an increase of 13.39 - 20.40% plant height; 46.34 - 81.82% number of branches; 6.38 - 14.22% fresh biomass; 14.74 - 20.41% panicle length; 49.77 - 84.72% number of panicles per m²; 2.27 - 8.02% number of grains/panicle; 3.45 - 7.54% percentage of filled grains and 0.86 - 2.51% volume of 1.000 grains compared to two control treatments. Moreover, both these varieties had good tolerance to diseases. Therefore, the yield of VHI reached 95.46 quintals/ha, which was 1.79 - 2.16 times higher than in the control formulas. Overall, *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41 and *Enterobacter* sp. RDLN105 are two potential rhizobacteria that could be used in research on biofertilizer production applied in sustainable rice cultivation.*

Keywords: purple rice, plastic - house conditions, Rhizobacteria, *Stenotrophomonas maltophilia* RDL1B41 and *Enterobacter* sp. RDLN105.

TUYỂN CHỌN XẠ KHUẨN VÙNG RỄ CÂY HỒ TIÊU CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG *Fusarium* sp. VÀ TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro*

Trịnh Thị Huyền Trang^{1*},
Trần Thị Phương Hạnh¹, Lê Thị Thu Sa¹

¹Trường Đại học Tây Nguyên

* E-mail liên hệ: tttrang@ttn.edu.vn; ĐT: 0932. 012.705

TÓM TẮT

Nấm *Fusarium* sp. và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. là tác nhân chính gây bệnh vàng lá chết chậm trên cây hồ tiêu. Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu tại 3 tỉnh Đắk Lắk, Đắk Nông và Gia Lai. Hai mươi chủng xạ khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu đã được phân lập. Nghiên cứu cũng đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn DS1 có khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. với hiệu lực ức chế nấm bệnh đạt 55,33% và chủng BMI có khả năng kháng tuyến trùng với hiệu lực kháng tuyến trùng đạt 90,96%. Cả hai chủng đều có hoạt tính chitinase và protease. Chủng DS1 và BMI được định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA với tên khoa học lần lượt là *Streptomyces parvus* và *Nocardioides luteus*.

Từ khóa: hồ tiêu, xạ khuẩn vùng rễ, *Fusarium* sp., tuyến trùng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồ tiêu là cây công nghiệp có giá trị kinh tế lớn ở Việt Nam và là cây gia vị có tính chất thương mại quan trọng nhất trong các loại gia vị mà hiện đang có giá trị để xuất khẩu. Ở cây hồ tiêu, bệnh vàng lá là một trong những bệnh quan trọng nhất trên cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) gây thiệt hại nhiều về kinh tế cho người dân (Nguyễn Tăng Tôn, 2009). Cây bị bệnh này có triệu chứng vàng lá và thối rễ, sau đó rụng lá, các cây bị nhiễm bệnh chết trong một khoảng thời gian ngắn. Trong giai đoạn đầu nhiễm bệnh, cây hồ tiêu non vẫn phát triển bình thường. Tuy nhiên, các triệu

chứng vàng lá xuất hiện khi cây non được hơn 4 tháng tuổi. Sự biến đổi màu lá thường bắt đầu từ gốc và dần dần lan lên ngọn. Bệnh xảy ra ở cả cây hồ tiêu non và già. Khi nhiễm nặng, cây bị thối rễ chính và dẫn đến chết. Một trong những tác nhân gây bệnh vàng lá là do nấm *Fusarium* sp. kết hợp với tuyến trùng gây ra (Shahnazi *et al.*, 2012; Nguyễn Mạnh Chinh, 2007).

Theo Cục Bảo vệ thực vật, tháng 4/2022 trên cả nước tổng diện tích hồ tiêu bị nhiễm bệnh chết chậm là 2.528 ha (trong đó diện tích nhiễm nặng 387 ha) và phân bố tập trung tại các tỉnh: Gia Lai, Đắk Lắk, Bình Thuận, Đắk Nông, Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Lâm Đồng, Đồng Nai, Bình Phước, Kiên

Người phân biên: TS. Đỗ Thị Kiều An

Giang, Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Dương. Để kiểm soát bệnh này nhiều biện pháp đã được áp dụng bao gồm: luân canh cây trồng, sử dụng giống kháng bệnh, sử dụng các loại thuốc hóa học để diệt nấm bệnh và tuyến trùng, sử dụng các biện pháp sinh học. Tuy nhiên, các thuốc hóa học có tác động xấu đến môi trường và sức khỏe con người, ngoài ra, có thể thúc đẩy sự phát triển của các chủng nấm gây bệnh và tuyến trùng. Nhằm kiểm soát bệnh do nấm *Fusarium* và tuyến trùng gây ra, các biện pháp sinh học sử dụng vi sinh vật trong đó có xạ khuẩn vùng rễ đang được nhiều nghiên cứu hướng tới (Kaur *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2022).

Trên thế giới đã ghi nhận nhiều chủng xạ khuẩn vùng rễ như *Streptomyces hirosimensis*, *Streptomyces misionensis*, *Streptomyces padanus*, có khả năng nấm *Fusarium* và tuyến trùng gây hại cây hồ tiêu, góp phần vào công tác bảo vệ thực vật và xây dựng nền nông nghiệp an toàn và bền vững (Bhai *et al.*, 2016). Xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp đa dạng các loại enzyme ngoại bào và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cao (Nguyễn Thị Diệu Hạnh, 2021). Vì vậy, tuyển chọn các chủng xạ khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu có khả năng kháng *Fusarium* sp. và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. sẽ góp phần giải quyết bệnh chết chậm do nấm *Fusarium* sp. và tuyến trùng gây bệnh trên cây hồ tiêu ở các tỉnh Tây Nguyên.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Xạ khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) thu thập tại các tỉnh Đắk Lắk, Đắk Nông và Gia Lai.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập các chủng xạ khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu.

- Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn vùng rễ có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cao trong phòng thí nghiệm.

- Định danh chủng có hoạt tính kháng *Fusarium* sp. và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cao.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thu mẫu

Mẫu rễ được thu ở các vườn hồ tiêu sinh trưởng khỏe, năng suất cao, ổn định, ít bị bệnh rễ hoặc tại các cây tiêu khỏe mạnh trên vườn tiêu bệnh. Thu rễ ở cây hồ tiêu 3 đến 10 năm tuổi. Chọn mẫu rễ non và rễ tơ vì đây là nơi có nhiều vi sinh vật tập trung. Thu rễ phần rìa ngoài cách trụ tiêu bán kính khoảng 1,0 - 1,5 m; độ sâu rễ từ 10 - 20 cm, lấy khoảng 10 cm từ đầu nút của rễ vào. Mẫu rễ sau đó sẽ được giữ trong túi polyetylen vô trùng, chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập ngay. Nếu chưa kịp xử lý, cần bảo quản trong tủ lạnh ở 5°C cho đến khi tiến hành phân lập.

2.3.2. Phương pháp phân lập

Cân 5 g/mẫu rễ tiêu, cắt ngắn khoảng 1 - 2 cm rồi cho vào bình tam giác 100 ml, cho 15 ml nước cất đã hấp khử trùng, lắc cho sạch đất, thu dịch lần 1. Rễ sau đó được tiếp tục cho vào bình tam giác 100 ml và cho 15 ml nước cất đã hấp khử trùng lắc cho sạch đất thu dịch lần 2. Tiếp tục làm như trên để thu dịch lần 3. Sau đó, cho các mẫu rễ vào các ống ly tâm nhựa 25 ml (Falcon 25 ml) có chứa 15 ml dung dịch PBST (đệm phốt phát + muối sinh lý + Tween 20). Cho các ống ly tâm vào bể

siêu âm trong 60 giây, sau đó chuyển rễ sang ống ly tâm mới chứa 15 ml PBST, siêu âm tiếp 60 giây lần hai, chuyển rễ sang ống ly tâm thứ ba chứa 15 ml PBST và siêu âm trong 10 phút. Cấy trải trên môi trường Gause I và ủ ở nhiệt độ 30°C trong vòng 3 - 4 ngày. Các khuẩn lạc được làm thuần, lưu giữ ở - 80°C trong glycerol.

2.3.3. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn vùng rễ có hoạt tính kháng *Fusarium sp.* cao trong phòng thí nghiệm

* *Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng Fusarium (Toh và cs., 2016):* cấy nấm bệnh ở giữa đĩa petri, cấy ba chủng xạ khuẩn đối kháng ở gần mép đĩa cách vị trí cấy nấm bệnh 3 cm, mỗi chủng xạ khuẩn cấy khoảng 1 - 2 cm, mỗi thí nghiệm thử tính đối kháng lặp lại 3 lần. Quan sát tính đối kháng từng ngày cho đến khi sợi nấm tiếp xúc với xạ khuẩn và cho đến khi nấm mọc phủ qua ăn chết xạ khuẩn (trường hợp xạ khuẩn không đối kháng được với nấm). Chỉ tiêu theo dõi: bán kính khuẩn lạc; khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn vùng rễ đối với nấm bệnh sau 7 ngày thử nghiệm. Cách tính khả năng đối kháng *Fusarium sp.* của xạ khuẩn như sau:

$$\text{PIRG} (\%) = [(R1 - R2)/R1] \times 100$$

Trong đó: PIRG: tỉ lệ ức chế tăng trưởng bán kính nấm bệnh của xạ khuẩn (%); R1: bán kính tăng trưởng của nấm bệnh *Fusarium sp.* (cm) (đĩa đối chứng); R2: bán kính tăng trưởng của nấm bệnh *Fusarium sp.* khi cấy xạ khuẩn đối kháng (cm).

Đánh giá khả năng đối kháng của xạ khuẩn: PIRG < 10% = không có hoạt tính kháng nấm (-); 10% < PIRG < 30% = hoạt tính kháng nấm thấp (+); 30 < PIRG < 50% = hoạt tính kháng nấm trung bình (++); 50 < PIRG < 70% = hoạt tính kháng nấm cao

(+++); PIRG 70% = hoạt tính kháng nấm rất cao (++++).

2.3.4. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn vùng rễ có hoạt tính kháng tuyến trùng cao trong điều kiện in vitro

* *Phương pháp xác định mật độ bào tử các chủng xạ khuẩn vùng rễ:* nuôi xạ khuẩn trong Gause lỏng từ 2 - 3 ngày, sau đó đếm trong buồng đếm hồng cầu, soi trên kính hiển vi quang học, đếm mật độ bào tử xạ khuẩn đạt 10^7 bào tử/ml. Công thức tính mật độ bào tử xạ khuẩn:

$$\text{Mật độ} = \frac{a \times 4000}{5 \times 16} \times N \times 1000$$

Trong đó: a: tổng số bào tử đếm được trong 5 ô lớn, N: độ pha loãng.

* *Thu nhận tuyến trùng từ trứng:* thu nhận rễ tiêu bị u sưng (khi thu nhận sử dụng kéo sạch và cắt sát, không để vết thương hở tiếp xúc với đất), đựng trong túi nylon sạch. Rửa sạch rễ đã thu nhận, dùng dao lam hoặc dao rọc giấy, cắt phần vỏ, lấy các bọc trứng chuyển vào đĩa petri, bỏ sung nước cất vô trùng, đậy nắp đĩa petri, để tối, ủ ở nhiệt độ phòng từ 24 - 48 giờ. Đếm xác định mật độ tuyến trùng sống để tiến hành đánh giá hoạt tính kháng tuyến trùng của các chủng xạ khuẩn.

* *Phương pháp xác định hoạt tính kháng tuyến trùng trong điều kiện in vitro:* xạ khuẩn đã được làm thuần trong môi trường Gause lỏng đạt mật độ 10^7 bào tử/ml. Chuyển 1 ml dịch nuôi cấy vào eppendorf, ly tâm 3000 vòng/7 phút, sau đó bỏ dịch thu cặn. Hòa cặn với 400 µl nước cất, sục đều, bổ sung dịch nuôi cấy chứa khoảng 30 tuyến trùng. Nuôi trong điều kiện nhiệt độ phòng, sau 24 giờ, đếm xác định số tuyến trùng chết. Thí nghiệm lặp lại 3 lần đối với mỗi chủng xạ khuẩn. Đối chứng là nước cất.

- *Xác định tỷ lệ tử vong*: sau 24 giờ đếm số lượng tuyến trùng đã chết trên tổng số tuyến trùng ban đầu. Hoạt tính kháng tuyến trùng được xác định dựa trên phần trăm kháng hay tỉ lệ tử vong tuyến trùng.

$$\text{Tỷ lệ tử vong (\%)} = \frac{\text{Số tuyến trùng chết}}{\text{Tổng số tuyến trùng}} \times 100$$

Hoạt tính cao (+++): tỉ lệ tử vong trên 80%; hoạt tính trung bình (++): tỉ lệ tử vong từ 60 - 80%; hoạt tính yếu (+): tỉ lệ tử vong dưới 60%; không có hoạt tính (-): tỉ lệ tử vong 0%.

- *Xác định hiệu lực kháng*: hiệu quả ức chế tiêu diệt tuyến trùng tại thời điểm của xạ khuẩn được hiệu tính theo công thức Henderson - Tilton:

$$HL (\%) = (1 - \frac{(Ta \times Cb)}{(Tb \times Ca)}) \times 100$$

Trong đó: HL: hiệu lực, T_a : mật độ tuyến trùng ở công thức xử lý sau thí nghiệm; T_b : mật độ tuyến trùng ở công thức xử lý trước thí nghiệm, C_a : mật độ tuyến trùng ở công thức đối chứng sau thí nghiệm, C_b : mật độ tuyến trùng ở công thức đối chứng trước thí nghiệm.

2.3.5. *Xác định hoạt tính enzyme chitinase và protease của chủng tuyển chọn*

Các chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Gause I bổ sung các cơ chất chitin 1%, casein 1% không có agar, ở 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, nuôi cấy trong 5 ngày, sau đó ly tâm dịch nuôi cấy (6000 vòng/15 phút), thu dịch trong. Dịch này được sử dụng để xác định hoạt tính chitinase (UI/ml) theo phương pháp định lượng đường khử với thuốc thử DNS và enzyme protease (UI/ml) theo phương pháp Anson cải biên.

2.3.6. *Định danh sinh học phân tử chủng có hoạt tính kháng Fusarium sp. và tuyến trùng Meloidogyne sp. cao*

Chủng có khả năng đối kháng cao nhất với *Fusarium sp.* và tuyến trùng *Meloidogyne sp.* trong điều kiện *in vitro* được định danh phân tử bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA với cặp mồi 27F 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' và 1492R 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3' và phương trình PCR như sau 95°C - 5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo (95°C - 30 giây; 55°C - 40 giây; 72°C - 90 giây) và 72°C - 5 phút tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa (793/62 Trần Xuân Soạn, quận 7, Hồ Chí Minh) và kết quả giải trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu 16S-rRNA của xạ khuẩn có sẵn trên National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng công cụ BLASTN <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

2.3.7. *Xử lý số liệu*

Số liệu sau khi ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích ANOVA bằng phần mềm SAS 9.1.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. *Phân lập các chủng xạ khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu*

Nghiên cứu đã phân lập được 20 chủng xạ khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu tại tỉnh Gia Lai, Đắk Nông và Đắk Lắk. Các chủng chủ yếu được phân lập tại vùng rễ của cây hồ tiêu giống Vĩnh Linh trên nền đất đỏ bazan và được sử dụng làm vật liệu cho các nghiên cứu tuyển chọn tiếp theo. Lê Thị Hiền và cộng sự (2014) đã xác định các

chủng xạ khuẩn có tính đối kháng cao với nấm hại thực vật. Từ 8 mẫu đất khác nhau, đã phân lập và làm thuần được 43 chủng xạ khuẩn, phân thành 7 nhóm màu với tỉ lệ khác nhau: trắng - 37,2%; xám - 22,9%; nâu - 14,0%; vàng - 11,6%; hồng - 2,3%; tím - 2,3%; xanh - 4,7%.

3.2. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng *Fusarium* sp. cao trong phòng thí nghiệm

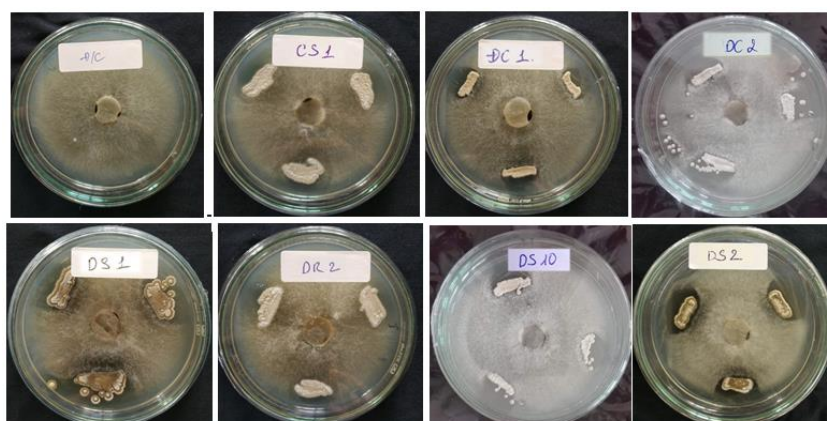
Để tuyển chọn khả năng đối kháng của một số chủng xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium* sp. gây bệnh trên cây hồ tiêu, từ 20 chủng xạ khuẩn vùng rễ phân lập được nuôi cấy trên môi trường PGA cùng với nấm *Fusarium* sp. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm gây bệnh *Fusarium* sp. được thể hiện qua tỷ lệ ức chế

tăng trưởng bán kính nấm bệnh của chủng nấm (PIRG). Kết quả được ghi nhận ở bảng 1. Trong số 20 chủng xạ khuẩn, 2 chủng xạ khuẩn DS1 và DS2 có tỷ lệ ức chế tăng trưởng bán kính nấm bệnh cao nhất, lần lượt đạt 55,33% và 49,16%. Trong khi đó, nghiên cứu của Lê Thị Hiền và cộng sự (2014) đã xác định các chủng xạ khuẩn có tính đối kháng cao với nấm hại thực vật, trong số 16 chủng đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* đã tuyển chọn được 2 chủng xạ khuẩn HN6 và NA1 có hoạt tính kháng nấm mạnh nhất đạt 37,2% và 25,6%. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Diệu Hạnh (2021) đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn CNXK121 có khả năng đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti* với đường kính kháng nấm (D-d) từ 1 - 20 mm.

Bảng 1. Khả năng đối kháng nấm *Fusarium* sp. của các chủng xạ khuẩn vùng rễ trong điều kiện in vitro

TT	Chủng xạ khuẩn	PIRG% *	Kết luận khả năng đối kháng**	TT	Chủng xạ khuẩn	PIRG% *	Kết luận khả năng đối kháng**
1	DC1	0,00 ^e	-	13	CJ1	47,50 ^{bc}	++
2	DC2	0,00 ^e	-	14	DR1	45,00 ^c	++
3	DS1	55,33 ^a	+++	15	DR2	0,00 ^e	-
4	DS2	49,16 ^b	++	16	DR3	0,00 ^e	-
5	DS3	0,00 ^e	-	17	BM1	0,00 ^e	-
6	DS4	0,00 ^e	-	18	BM2	0,00 ^e	-
7	DS5	40,83 ^d	++	19	CS1	0,00 ^e	-
8	DS6	48,00 ^b	++	20	CS2	0,00 ^e	-
9	DS7	0,00 ^e	-	21	Đ/C	-	-
10	DS8	0,00 ^e	-		P	**	-
11	DS9	48,33 ^b	++		CV (%)	8,06	-
12	DS10	0,00 ^e	-				

Ghi chú: DC: đĩa nấm bệnh *Fusarium*; PIRG: tỉ lệ ức chế tăng trưởng bán kính nấm bệnh của xạ khuẩn (%). DC: Đứơc Cơ, DS: Đắc Song, CJ: Cư Jut, DR: Đắc Rlap, BM: Buôn Mê, CS: Chư Sê. *: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan với $P < 0,01$; ** PIRG < 10% = không có hoạt tính kháng nấm (-); 10% < PIRG < 30% = hoạt tính kháng nấm thấp (+); 30 < PIRG < 50% = hoạt tính kháng nấm trung bình (++); 50 < PIRG < 70% = hoạt tính kháng nấm cao (+++); PIRG 70% = hoạt tính kháng nấm rất cao (++++).



Hình 1. Khả năng kháng nấm *Fusarium* của một số chủng xạ khuẩn vùng rẫy

3.3. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn vùng rẫy có khả năng kháng tuyến trùng

Để tuyển chọn khả năng đối kháng của một số chủng xạ khuẩn đối với tuyến trùng gây bệnh trên cây hồ tiêu, 20 chủng xạ khuẩn vùng rẫy được phân lập từ tỉnh

Gia Lai, Đắk Nông và Đắk Lắk đã được nuôi cấy trên môi trường Gause. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn được đánh giá thông qua tỉ lệ tử vong của tuyến trùng và hiệu lực kháng, ghi nhận kết quả ở bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính kháng tuyến trùng của các chủng xạ khuẩn vùng rẫy

TT	Chủng	Tỉ lệ tử vong (%)*	HL (%)*	Hoạt tính kháng tuyến trùng**
1	DC1	58,46 ^g	58,33 ^g	+
2	DC2	82,71 ^{a-e}	82,00 ^{a-e}	+++
3	DS1	80,80 ^{a-e}	80,00 ^{a-f}	+++
4	DS2	69,64 ^{c-g}	68,00 ^{d-g}	++
5	DS3	88,08 ^{ab}	87,33 ^{a-c}	+++
6	DS4	68,55 ^{d-g}	67,00 ^{e-g}	++
7	DS5	64,76 ^{gf}	63,33 ^g	++
8	DS6	81,46 ^{a-e}	80,33 ^{a-f}	+++
9	DS7	83,09 ^{a-d}	82,33 ^{a-e}	+++
10	DS8	63,15 ^{gf}	61,66 ^g	++
11	DS9	84,44 ^{a-c}	84,00 ^{abc}	+++
12	DS10	87,01 ^{ab}	86,66 ^{a-c}	+++
13	CJ1	83,18 ^{a-d}	82,66 ^{a-d}	+++
14	DR1	84,54 ^{a-c}	84,00 ^{a-c}	+++
15	DR2	67,80 ^{e-g}	66,33 ^{gf}	++
16	DR3	73,07 ^{b-g}	72,00 ^{c-g}	++
17	BM1	90,96 ^a	90,00 ^a	+++
18	BM2	40,16 ^h	37,66 ^h	+
19	CS1	76,33 ^{a-f}	75,33 ^{b-g}	++
20	CS2	88,88 ^a	88,66 ^{ab}	+++
	Đ/C	4,30 ⁱ		
<i>P</i>		**	**	
CV (%)		9,41	9,35	

Ghi chú: HL: hiệu lực kháng tuyến trùng của xạ khuẩn (%); *: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan với $P < 0,01$; **: khả năng đối kháng tuyến trùng: (+++): hoạt tính rất cao > 80%; (++) : hoạt tính cao 60 - 80%; (+): hoạt tính trung bình < 60%; (-): hoạt tính yếu 0%.

Qua kết quả trình bày ở bảng 2 và quan sát tỉ lệ số tuyến trùng trên kính soi nổi, khả năng kháng tuyến trùng có sự khác biệt giữa các chủng được tuyển chọn. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với tuyến trùng được thể hiện qua tỉ lệ tử vong của tuyến trùng. Trong số 20 chủng xạ khuẩn, 11 chủng xạ khuẩn có tỉ lệ tử vong tuyến trùng cao gồm BM1, CS2, DS3, DS10, DR1, DS9, CJ1, DS7, DC2, DS6, DS1 và chiếm 55%. Zhang *et al.* (2021) đã tuyển chọn được 17 chủng xạ khuẩn vùng rễ có khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* TR4 trong đó chủng BITDG-11 có hoạt tính kháng cao nhất đạt $80,48 \pm 1,49\%$. Nghiên cứu của Cao *et al.* (2022) đã phân lập được 17 chủng xạ khuẩn vùng rễ cây chuối có khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* TR4 trong đó chủng Y1-14 có hoạt tính kháng cao nhất đạt 71,42%.

3.4. Hoạt tính enzyme protease và chitinase của các chủng xạ khuẩn vùng rễ có khả năng kháng nấm và tuyến trùng

Theo Schoffemeer *et al.* (1999), thành tế bào nấm *Fusarium* sp. được cấu tạo bởi chitin, protein. Vì vậy, một trong những cơ chế kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm bệnh là tổng hợp các enzyme phân giải thành tế bào như protease, chitinase. Bên cạnh đó, các enzyme này có thể tác động lên da và trứng tuyến trùng. Do đó, nghiên cứu xác định hoạt tính enzyme protease và chitinase nhằm đánh giá tác động của enzyme lên khả năng kháng nấm và tuyến trùng. Kết quả bảng 3 cho thấy, cả hai chủng đều có hoạt tính enzyme chitinase và hoạt tính enzyme protease. Chủng DS1 có hoạt tính enzyme chitinase cao hơn so với chủng BM1. Tuy nhiên, chủng này lại có hoạt tính protease thấp hơn so với chủng BM1.

Bảng 3. Hoạt tính enzyme chitinase và protease của chủng xạ khuẩn tuyển chọn

Chủng	Hàm lượng đường khử trong dịch nuôi cấy (mg/ml)	Hoạt tính chitinase (U/ml)	Hàm lượng tyrosin trong dịch nuôi cấy (mg/ml)	Hoạt tính protease (U/ml)
DS1	34,46	2,29	0,29	0,07
BM1	21,62	1,46	0,46	0,11

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Diệu Hạnh (2021) đã xác định 21 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào với kích thước vòng phân giải casein là 24 ± 2 mm, cao nhất chủng xạ khuẩn CNXK28.1. Đồng thời, 21 chủng xạ khuẩn được xác định có khả năng sinh chitinase ngoại bào với đường kính là 36 ± 1 mm, chủng xạ khuẩn CNXK22 có kích thước vòng phân giải chitin cao nhất.

3.5. Định danh sinh học phân tử chủng có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. và tuyến trùng *Meloidogyne*. sp cao

Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA cho thấy, chủng DS1 và BM1 có tên khoa học lần lượt là *Streptomyces parvus*, *Nocardioides luteus*. Hiện nay, xạ khuẩn được sử dụng trong sản xuất nông nghiệp bền vững vì nó có thể giúp kích thích sinh trưởng và tăng

năng suất cây trồng bằng cơ chế trực tiếp như cố định nitơ trong khí quyển, hòa tan các khoáng chất như phốt-pho, kali và kẽm, sản xuất siderophores và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như cytokinin, auxin và gibberellin, hoặc bằng cơ chế gián tiếp thông qua sản xuất các hợp chất đối kháng ức chế lại mầm bệnh thực vật (Yadav *et al.*, 2018). *Streptomyces* là chi có khả năng sản xuất kháng sinh lớn nhất trong giới vi sinh vật. Một số nghiên cứu đã chứng minh *Streptomyces* spp. có khả năng ức chế nấm *Fusarium* trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro* (Bubici, G. , 2018; Zhang *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2022;). Bên cạnh đó, enzyme chitinase do *Streptomyces* spp. tổng hợp đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sinh học các bệnh do nấm *Fusarium* (Bubici, G., 2018). Xạ khuẩn thuộc chi *Nocardioides* là một trong số ít chi xạ khuẩn có chứa acid LL-2,6-diaminopimelic (LL-DAP) trong lớp peptidoglycan ở thành tế bào. Đặc biệt, chỉ một số loài thuộc chi *Nocardioides* có khả năng sản xuất kháng sinh (El-Refai *et al.*, 2011).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 20 chủng xạ khuẩn ngoại sinh vùng rễ cây hồ tiêu tại huyện Đức Cơ và Chư Sê thuộc tỉnh Gia Lai, Đăk Nông và Đăk Lắk. Tuyển chọn được chủng xạ khuẩn vùng rễ hồ tiêu DS1 và BM1 có khả năng kháng nấm *Fusarium* và tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cao với tên khoa học là *Streptomyces parvus* và *Nocardioides luteus*. Chủng DS1 có hiệu lực ức chế nấm bệnh đạt 55,33% và chủng BM1 gây tử vong tuyến

trùng đạt 90,96%. Cả hai chủng DS1 và BM1 đều có hoạt tính enzyme chitinase và protease. Các chủng xạ khuẩn này sẽ được sử dụng để sản xuất chế phẩm sinh học, thử nghiệm trong điều kiện vườn ươm và đồng ruộng nhằm kiểm soát nấm bệnh và tuyến trùng trên cây hồ tiêu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục Bảo vệ thực vật (2022). Thông báo tình hình sinh vật gây hại chủ yếu 7 ngày trên một số cây trồng.
2. Nguyễn Mạnh Chinh, Nguyễn Đăng Nghĩa (2007). *Trồng - chăm sóc và phòng trừ bệnh cây hồ tiêu*, Bác sĩ cây trồng, quyển 22. Nxb. Nông nghiệp Tp. Hồ Chí Minh.
3. Nguyễn Tăng Tôn (2009). Nghiên cứu tuyển chọn giống và các biện pháp kỹ thuật canh tác tiên tiến phục vụ phát triển bền vững ngành hàng hồ tiêu. *Báo cáo tổng kết đề tài KH&CN*.
4. Nguyễn Thị Diệu Hạnh, Hứa Trường Chinh, Đặng Bích Ngân, Nguyễn Thị Thanh Thúy, Nguyễn Ngọc Ân, Phạm Tấn Việt (2021). Phân lập và tuyển chọn xạ khuẩn có khả năng sinh các hợp chất có hoạt tính cao. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, số 53B, 2021, trang 56 - 67.
5. Lê Thị Hiền, Đinh Văn Lợi, Vũ Thị Vân, Nguyễn Văn Giang (2014). Phân lập các chủng xạ khuẩn có tính đối kháng cao với nấm hại thực vật. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* - Vol. 5, trang 56 - 67.
6. Bhai, R. S., Lijina, A., Prameela, T. P., Krishna, P. B., & Thampi, A. N. U. S. R. E. E. (2016). Biocontrol and growth promotive potential of *Streptomyces* spp. in black pepper (*Piper nigrum* L.). *J Biol Control*, 30(3), 63 - 71.
7. Bubici, G. (2018). *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Fusarium* species. *CABI Reviews*, (2018), 1 - 15.
8. Cao, M., Cheng, Q., Cai, B., Chen, Y., Wei, Y., Qi, D.,... & Wang, W. (2022). Antifungal Mechanism of Metabolites from Newly Isolated *Streptomyces* sp. Y1 - 14 against

- Banana Fusarium Wilt Disease Using Metabolomics. *Journal of Fungi*, 8(12), 1291.
9. El-Refai, H. A., AbdElRahman, H. Y., Abdulla, H., Hanna, A. G., Hashem, A. H., A. H., & Ahmed, E. M. (2011). Studies on the production of actinomycin by *Nocardioides luteus*, a novel source. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 5(3), 1282 - 1297.
 10. Kaur, J., Gangwar, M., & Kaur, S. (2017). Screening of endophytic and rhizospheric actinomycetes with potential application for biocontrol of Fusarium wilt of Gladiolus. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 6(7), 1345 - 1355.
 11. Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K., & Nejat, N. (2012). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*, 78, 160 - 169.
 12. Siddiqui, ZA (2006). *PBPR: Prospective Biocontrol agents of plant pathogens. p111 - 142. In ZA, Siddiqui (ed). PGPR: Biocontrol and fertilization.* Springer.
 13. Schoffelmeyer, E. A., Klis, F. M., Sietsma, J. H., & Cornelissen, B. J. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol*, 27 (2-3), 275-282. 10.1006/fgbi.1999.1153
 14. Toh, S. C, Samuel, L. and Awang, A. S. A. H. (2016). Screening for antifungal - producing bacteria from *Piper nigrum* plant against *Phytophthora capsici*. *International Food Research Journal* 23(6): 2616 - 2622.
 15. White, L. J., Brözel, V. S., & Subramanian, S. (2015). Isolation of rhizosphere bacterial communities from soil. *Bio - protocol*, 5(16), e1569 - e1569.
 16. Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, S., Kumar, V., Kumar, M., Sugitha, T. C. K., & Dhaliwal, H. S. (2018). Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 13 - 41). Elsevier.
 17. Zhang, L., Zhang, H., Huang, Y., Peng, J., Xie, J., & Wang, W. (2021). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrolling *Fusarium* wilt of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *Frontiers in Microbiology*, 3057.

ABSTRACT

Selection of antagonistic rhizosphere actinomycetes against *Fusarium* sp. AND *Meloidogyne* sp. on black pepper (*Piper nigrum* L.) *in vitro*

Fusarium sp. and *Meloidogyne* sp. are the primary causative agents of yellow leaf disease in black pepper. The aim of this study was to isolate and select antagonistic rhizosphere actinomycetes against *Fusarium* sp. and *Meloidogyne* sp. in the provinces of Dak Lak, Dak Nong, and Gia Lai. Twenty rhizosphere actinomycete strains were isolated herein. The study selected strain DSI, which exhibited an inhibitory potency of 55.33% against *Fusarium* sp., and strain BM1, which demonstrated an anti - nematode potency of 90.96% against *Meloidogyne* sp. All actinomycete strains also possessed chitinase and protease activities. Strains DSI and BM1 were identified using 16S rRNA sequencing method, resulting in the scientific names *Streptomyces parvus* and *Nocardioides luteus*, respectively.

Keywords: *Fusarium* sp., nematode, rhizosphere actinomyces, black pepper.

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ pH MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN VỚI NẤM *Colletotrichum* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro*

Võ Thị Hương Dương¹, Lê Nam Đô¹, Nguyễn Phú Dũng¹

¹Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện trong phòng thí nghiệm Trường Đại học An Giang nhằm khảo sát khả năng sinh trưởng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. của xạ khuẩn APAG ở các độ pH của môi trường nuôi cấy khác nhau. Thí nghiệm về ảnh hưởng của độ pH môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng của xạ khuẩn được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức (pH 5, 6, 7, 8, 9). Kết quả thí nghiệm cho thấy xạ khuẩn APAG phát triển phát triển tốt nhất ở pH 7 (6.11×10^7 CFU/ml ở 7 ngày sau khi trải đĩa). Thí nghiệm về ảnh hưởng của độ pH môi trường nuôi cấy lên khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 6 nghiệm thức (pH 5, 6, 7, 8, 9 và đối chứng - nước cất thanh trùng). Kết quả cho thấy xạ khuẩn nuôi cấy ở môi trường pH 5 - 6 có khả năng đối kháng mạnh nhất (51,79% ở 12 ngày sau khi thử đối kháng).

Từ khóa: xạ khuẩn, môi trường nuôi cấy, *Colletotrichum* sp., sinh trưởng, đối kháng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thán thư (thối trái) do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra là bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng trong canh tác ớt và làm tổn thất từ 10 - 80% tổng sản lượng ớt trên thế giới cũng như Việt Nam. Hiện nay, thuốc hoá học đang được sử dụng phổ biến để quản lý bệnh thán thư, nhưng việc sử dụng liên tục dễ khiến mầm bệnh hình thành tính kháng và làm giảm độ an toàn cho nông sản. Vấn đề mất cân bằng hệ sinh thái, ô nhiễm môi trường và nhất là ảnh hưởng đến sức

khỏe người tiêu dùng đang rất được quan tâm vì trái ớt thường được dùng trực tiếp mà không qua chế biến.

Biện pháp sinh học sử dụng xạ khuẩn để quản lý nấm bệnh đang được nghiên cứu và áp dụng thời gian gần đây nhằm thay thế biện pháp hoá học (Doubou và cs., 2001). Một số nghiên cứu ghi nhận xạ khuẩn có khả năng quản lý một số mầm bệnh gây hại cây trồng như: *Xanthomonas oryzae*, *Rhizoctonia solani* (Lê Minh Tường và Ngô Thị Kim Ngân, 2014), *Phytophthora citricola* (Haesler và cs., 2008), kích thích sinh trưởng và tạo kháng sinh (Taechowisan và cs., 2009). Tuy

Người phân biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Thanh Xuân

nhiên, xạ khuẩn nuôi cấy trên các loại môi trường ở độ pH khác nhau thì khả năng sinh trưởng và đối kháng cũng có thể khác nhau (Nguyễn Văn Giang, 2017). Xuất phát từ thực tế trên, đề tài được thực hiện nhằm xác định độ pH của môi trường nuôi cấy để nhân mật số và làm tăng tính kháng nấm của xạ khuẩn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Thí nghiệm tiến hành trên xạ khuẩn APAG - xạ khuẩn phân lập trong đất trồng ớt tại An Phú, An Giang và nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt.

Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn là môi trường MS ở các độ pH 5, 6, 7, 8, 9.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Thí nghiệm 1: khảo sát sinh trưởng của xạ khuẩn APAG qua các độ pH của môi trường nuôi cấy

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức, 4 lần lặp lại và mỗi lần lặp lại có 4 đĩa petri. Các nghiệm thức trong thí nghiệm là môi trường MS ở các độ pH 5, 6, 7, 8, 9.

Thử nghiệm nuôi xạ khuẩn ở các độ pH môi trường khác nhau: nhỏ 20 µl huyền phù xạ khuẩn vào đĩa petri chứa 10 ml môi trường MS với các độ pH khác nhau và sử dụng que chà thủy tinh phân bố đều xạ khuẩn trên bề mặt đĩa, để ở điều kiện phòng đến khi ghi nhận chỉ tiêu.

Chỉ tiêu theo dõi: ghi nhận mật số xạ khuẩn vào 2, 3, 4, 5, 6, 7 NSKC.

Đếm tất cả các khuẩn lạc xuất hiện, tính mật số qua công thức:

$$F = \frac{a.\alpha + b.\beta + c.\gamma}{3} : \frac{1000}{x}$$

Trong đó: F: mật số xạ khuẩn gốc.

a, b, c: số khuẩn lạc đếm được trên đĩa ở các độ pha loãng α , β , γ .

α , β , γ : nồng độ pha loãng tương ứng với a, b, c.

x: số µl rút chà lên đĩa (µl).

2.2.2 Thí nghiệm 2: khảo sát khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. của xạ khuẩn APAG ở các độ pH môi trường nuôi cấy khác nhau.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 6 nghiệm thức, 4 lần lặp lại. Các nghiệm thức trong thí nghiệm là xạ khuẩn nuôi trên môi trường MS ở các độ pH 5, 6, 7, 8, 9 và đối chứng là nước cất thanh trùng.

Xạ khuẩn được nuôi trong môi trường ở các độ pH (các nghiệm thức) trong 10 ngày, thu xạ khuẩn và hiệu chỉnh về mật số 10^8 CFU/ml để đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp.

Thử đối kháng: nhúng khoanh giấy thấm Whatman No 1 đường kính 5 mm đã thanh trùng vào dung dịch huyền phù xạ khuẩn, để ráo và đặt vào đĩa petri chứa 10 ml môi trường PDA, đối chứng là mẫu giấy thấm nhúng nước cất, khoanh nấm *Colletotrichum* sp. sử dụng với đường kính 5 mm. Mẫu giấy thấm xạ khuẩn và đối chứng đặt đối xứng nhau qua khoanh nấm và cách khoanh nấm 30 mm.

Chỉ tiêu theo dõi: bán kính vòng vô khuẩn; khả năng đối kháng của xạ khuẩn.

Ghi nhận chỉ tiêu mỗi ngày bắt đầu từ ngày thứ 2 sau khi đối kháng đến khi tản nấm phát triển đến đối chứng. Ghi nhận chỉ tiêu bằng cách dùng thước đo bán kính vô khuẩn; đo bán kính tản nấm từ tâm nấm phát triển về phía tâm xạ khuẩn và đối chứng để tính được HSDK qua công thức của Moayedı and Mostowfızadeh - ghalamfasa (2009):

$$\text{HSDK} (\%) = [(G1 - G2)/G1] * 100$$

Trong đó:

HSDK: hiệu suất đối kháng (%)

G1, G2: bán kính tản nấm phát triển về phía đối chứng, xạ khuẩn

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel và phần mềm SPSS để tính toán và xử lý số liệu. Phân tích ANOVA và phép thử DUCAN để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng sinh trưởng của xạ khuẩn APAG ở các độ pH của môi trường nuôi cấy

Kết quả ảnh hưởng của độ pH môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của xạ khuẩn APAG được thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

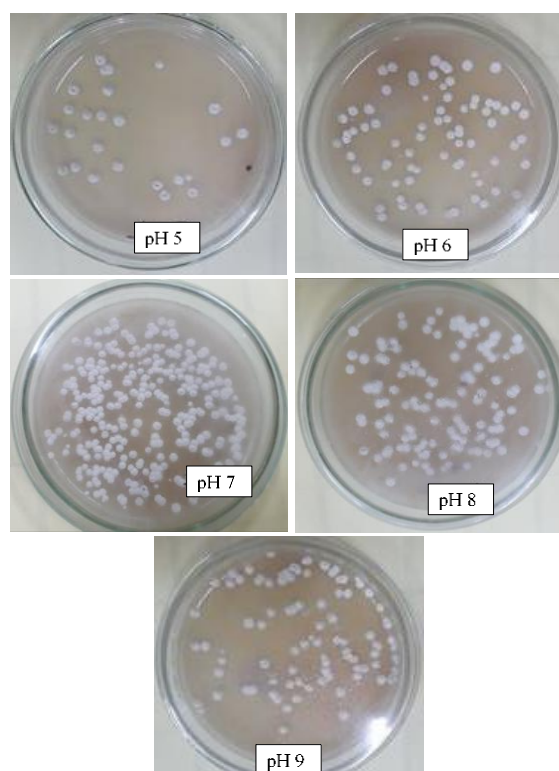
Bảng 1. Mật số của xạ khuẩn APAG ở các độ pH môi trường nuôi cấy

Nghiệm thức	Mật số xạ khuẩn ở các thời điểm					
	2 NSC	3 NSC	4 NSC	5 NSC	6 NSC	7 NSC
pH 5	3,44 ^d	4,74 ^d	5,05 ^d	5,21 ^e	5,43 ^e	5,51 ^e
pH 6	4,51 ^c	5,29 ^{cd}	5,65 ^c	5,72 ^d	5,78 ^d	5,83 ^d
pH 7	6,63 ^a	6,96 ^a	7,55 ^a	7,73 ^a	7,74 ^a	7,78 ^a
pH 8	6,17 ^a	6,34 ^b	6,61 ^b	6,81 ^b	6,85 ^b	6,88 ^b
pH 9	5,32 ^b	5,76 ^c	6,27 ^b	6,29 ^c	6,31 ^c	6,36 ^c
F	**	**	**	**	**	**
CV (%)	7,13	6,35	4,20	4,07	3,29	2,75

Ghi chú: trong cùng một cột các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa qua phép thử DUCAN. Số liệu chuyển sang log₁₀ khi xử lý thống kê. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Ở thời điểm 2 ngày sau cấy (NSC) môi trường ở các độ pH đều xuất hiện khuẩn lạc xạ khuẩn với mật số có khác biệt về thống kê ở ý nghĩa 1%. Cụ thể ở độ pH 7 (6,63) và độ pH 8 (6,17) có mật số cao nhất tương ứng với $53,11 \times 10^5$ CFU/ml và $19,28 \times 10^5$ CFU/ml khác biệt không có ý nghĩa thống kê và cao khác biệt có ý nghĩa thống kê với các độ pH còn lại. Mật số xạ khuẩn thấp nhất ở độ pH 5 (3,44) có mật số tương ứng với $0,03 \times 10^5$ CFU/ml.

Ở các thời điểm 3 - 7 NSC, mật số xạ khuẩn tiếp tục tăng dần và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các độ pH. Mật số xạ khuẩn cao nhất vẫn là độ pH 7 với mật số tại các thời điểm lần lượt là $0,92 \times 10^7$ CFU/ml; $3,57 \times 10^7$; $5,39 \times 10^7$; $5,63 \times 10^7$ và $6,11 \times 10^7$ (CFU/ml). Độ pH có mật số thấp hơn có khác biệt là pH 8, thấp tiếp theo là pH 9, thấp tiếp theo nữa là pH 6 và mật số thấp nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các mật số khác pH 5.



Hình 1. Mật số xạ khuẩn APAG ở độ pH môi trường ở 3 NSC

Qua kết quả như trên có thể nhận thấy với nghiên cứu Lê Thị Hiền và cs. (2014) độ pH 7 là thích hợp nhất cho sự phát triển môi trường có độ pH trung tính (pH = 7) của xạ khuẩn APAG. Kết quả này phù hợp là thích hợp cho xạ khuẩn nhân mật số.

3.2. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn APAG ở các độ pH của môi trường nuôi cấy với nấm *Colletotrichum* sp.

Bảng 2. Bán kính vô khuẩn của xạ khuẩn APAG ở các độ pH của môi trường nuôi cấy với nấm *Colletotrichum* sp.

Thí nghiệm	Bán kính vòng vô khuẩn (mm) ở các thời điểm					
	2 NSĐK	4 NSĐK	6 NSĐK	8 NSĐK	10 NSĐK	12 NSĐK
pH 5	21,33 ^a	19,12 ^a	18,62 ^a	17,83 ^a	16,79 ^a	15,62 ^a
pH 6	21,16 ^b	17,62 ^b	15,92 ^b	14,87 ^b	14,37 ^b	13,83 ^b
pH 7	21,26 ^{ab}	17,12 ^c	15,42 ^c	14,62 ^b	13,79 ^{bc}	13,37 ^b
pH 8	21,22 ^{ab}	17,37 ^{bc}	15,67 ^{bc}	14,42 ^b	13,92 ^{bc}	13,29 ^b
pH 9	21,17 ^b	17,25 ^{bc}	15,71 ^{bc}	14,50 ^b	13,58 ^c	13,17 ^b
ĐC	20,88 ^c	15,54 ^d	11,04 ^d	6,33 ^c	4,17 ^d	0,79 ^c
F	**	**	**	**	**	**
CV (%)	0,40	1,61	1,69	3,37	3,64	4,24

Ghi chú: trong cùng một cột các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa qua phép thử DUCAN. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. NSĐK: ngày sau đối kháng.

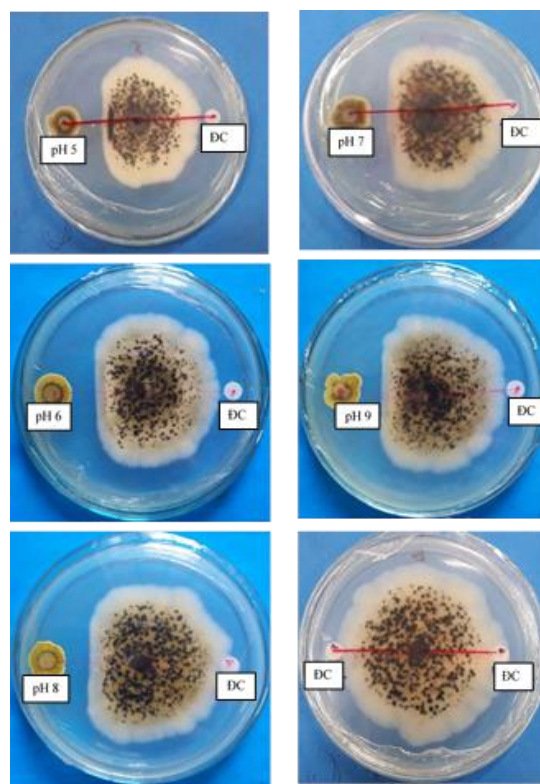
Bán kính vô khuẩn (BKVK) của xạ khuẩn APAG đối với nấm *Colletotrichum* sp., kết quả bảng 2 cho thấy nhìn chung có khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các độ pH môi trường nuôi cấy và các nghiệm thức đều cao có khác biệt so với đối chứng (bảng 2 và hình 2).

Ở thời điểm 2 ngày sau đối kháng (NSĐK), BKVK cao nhất là độ pH 5, 7 và 8 (21,33; 21,26 và 21,22 mm) khác biệt thống kê đối với độ pH 6 và 9 (21,16 và 21,17 mm).

Giai đoạn 4 - 12 NSĐK, BKVK đều giảm nhưng độ pH 5 vẫn cao có khác biệt thống kê với các độ pH còn lại ở mức ý nghĩa 1%. Độ pH môi trường 6, 7, 8, 9 nhìn chung không khác biệt nhau nhưng cao khác biệt so với đối chứng.

Hiệu suất đối kháng (HSDK), kết quả bảng 3 cho thấy HSDK tăng dần theo thời gian. Ở các thời điểm, HSDK của các nghiệm thức đều khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê. Nhìn chung HSDK của nghiệm thức pH 5 cao có ý nghĩa thống kê với các độ pH còn lại; nghiệm thức pH

6 có HKĐK không khác biệt với pH 5 ở thời điểm 4, 8 và 10 NSĐK.



Hình 2. Xạ khuẩn ức chế nấm ở 12 NSĐK

Bảng 3. Hiệu suất đối kháng của xạ khuẩn APAG ở các độ pH của môi trường nuôi cấy với nấm *Colletotrichum* sp.

Nghiệm thức	Hiệu suất đối kháng (%) ở các thời điểm					
	2 NSĐK	4 NSĐK	6 NSĐK	8 NSĐK	10 NSĐK	12 NSĐK
pH 5	6,74 ^a	19,92 ^a	32,21 ^a	37,60 ^{ab}	43,75 ^a	51,79 ^a
pH 6	4,22 ^b	17,42 ^{ab}	29,62 ^b	40,35 ^a	43,32 ^a	48,83 ^b
pH 7	5,67 ^{ab}	13,17 ^c	26,58 ^c	39,17 ^{ab}	41,25 ^{ab}	47,11 ^{bc}
pH 8	5,04 ^b	15,33 ^{bc}	28,10 ^{bc}	38,19 ^{ab}	41,78 ^{ab}	46,80 ^{bc}
pH 9	4,34 ^b	14,28 ^{bc}	28,35 ^{bc}	38,58 ^{ab}	40,35 ^b	46,33 ^c
F	**	**	**	**	**	**
CV (%)	15,45	16,06	5,47	4,74	5,19	3,37

Ghi chú: trong cùng một cột các số có cùng chữ theo sau giống nhau thì không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa qua phép thử DUCAN. **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Như vậy, ở các độ pH khác nhau BKVK và HSDK của xạ khuẩn APAG đối với nấm *Colletotrichum* sp. đều có sự

khác biệt. Điều này phù hợp với nhận định của Demain (1974) cho rằng sinh tổng hợp chất kháng sinh phụ thuộc rất nhiều

vào pH môi trường; độ pH tác động trực tiếp đến tính chất hệ keo của tế bào, đến hoạt lực của các enzym và tác động gián tiếp qua môi trường.

Từ kết quả trên cho thấy xạ khuẩn APAG trên nuôi cấy trên môi trường có độ pH từ 5 - 9 đều có khả năng đối kháng với nấm bệnh. Tuy nhiên, pH 5 - 6, xạ khuẩn APAG có khả năng đối kháng nấm bệnh và tạo ra vùng BKVK là lớn nhất. Kết quả nghiên cứu của Hoàng Thị Hồng và Nguyễn Ngọc Phương (2013) cũng cho rằng xạ khuẩn từ rừng ngập mặn sinh chất kháng nấm *Fusarium* sp. tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường pH 5 - 6.

4. KẾT LUẬN

Trong 5 độ pH của môi trường MS (5, 6, 7, 8, 9), pH 7 là độ pH phù hợp nhất để nhân nuôi xạ khuẩn. Trong khi đó, đối với nấm *Colletotrichum* sp. thì xạ khuẩn nuôi cấy trong môi trường MS với pH 5 - 6 có khả năng đối kháng mạnh nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Demain A.L.A. (1974). How do antibiotic - producing microorganism avoid suicide, *Annals of the New York academy of science*, 235, 601 - 602.
2. Doumbou, C. L., Salove M. H., Crawford D. L. and Beaulieu C. (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82(3): 85 - 102.
3. Haesler F., Hagn A., Frommberger M., Hertkorn N., Schmitt - Kopplin P., Mucnh J.C. and Schloter M. (2008). In vitro antagonism of an actinobacterial *Kitasatospora* isolate against the plant pathogen *Phytophthora citricola* as elucidate with ultrahigh resolution mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods* (75) 188 - 195
4. Hoàng Thị Hồng và Nguyễn Ngọc Phương. (2013). Phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn từ rừng ngập mặn Cần Giờ kháng nấm *Fusarium* sp.. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Sư phạm Tp. Hồ Chí Minh*.
5. Moayedi G. and R. Mostowfizadeh - ghalamfarsa. (2009). Antagonistic Activities of *Trichoderma* spp. on *Phytophthora* Root Rot of Sugar Beet. *Iran Agricultural Research* 28(2) 21 - 38.
6. Nguyễn Văn Giang, Đinh Văn Lợi, Phạm Hồng Hiến (2017). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy, môi trường dinh dưỡng đến khả năng sinh trưởng của chủng xạ khuẩn GL30. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp Việt Nam*. Vol 07(80).
7. Taechowisan, T., N. Chuaychot, S. Chanaphat, A. Wanbanjob and P. Tantiwachwutikul (2009). Antagonistic Effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Colletotrichum musae*. *Biotechnology*, 8: 86 - 92.

ABSTRACT

Effects of culture medium pH on growth and antagonistic to *Colletotrichum* sp. of actinomycetes strain in vitro condition

Studies were conducted in laboratory of An Giang University to investigate the ability of growth and antagonistic to Colletotrichum sp. of APAG actinomycetes strain at different pH of culture medium. Experiment on the effect of culture medium pH on the growth of APAG actinomycetes was laid out randomize complete design with 5 treatments (pH 5, 6, 7, 8, 9). Results showed that APAG actinomycetes grew best at pH 7 (6.11×10^7 CFU/ml at 7 days after spreading). Experiment on the effect of culture medium pH on the antagonistic to Colletotrichum sp. followed randomize complete design with 6 treatments (pH 5, 6, 7, 8, 9 and control - SDW). The highest antagonistic ability was found at pH 5 - 6 of the culture medium (51.79% at 12 days after culture).

Keywords: actinomycetes, culture medium, *Colletotrichum* sp., growth, antagonistic.

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM *Colletotrichum* sp. GÂY BỆNH THÁN THƯ HẠI NHÃN (*Dimocarpus longan*) TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Lê Minh Tường^{1*}, Lê Minh Quân², Lê Thị Ngọc Xuân¹

¹Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Phòng Nông nghiệp và Phát triển nông thôn huyện Bình Tân,
tỉnh Vĩnh Long

* E-mail liên hệ: lmtuong@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là nhằm tìm ra chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại nhãn. Kết quả phân lập được 105 chủng xạ khuẩn từ đất trồng cây nhãn ở một số tỉnh đồng bằng Sông Cửu Long. Có 19 trong tổng số 105 chủng xạ khuẩn phân lập thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại nhãn và 6 chủng xạ khuẩn (PĐ2-CT, BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG và CT40-HG) có khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. thể hiện qua bán kính vòng vô khuẩn lớn lần lượt là 8,8 mm; 7,8 mm; 7,8 mm; 7,4 mm; 7,4 mm và 7,6 mm và hiệu suất đối kháng cao lần lượt là 57,33%; 51,11%; 52,44%; 49,78%; 50,22% và 50,22% ở thời điểm 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm. Khả năng phân giải chitin của 6 chủng xạ khuẩn (PĐ2-CT, BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG và CT40-HG) cũng được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm với 5 lần lặp lại. Kết quả cho thấy chủng PĐ2-CT thể hiện khả năng phân giải chitin cao nhất thông qua bán kính vòng phân giải lớn nhất là 28,00 mm ở thời điểm 9 ngày sau khi cấy.

Từ khóa: bệnh thán thư hại nhãn, *Colletotrichum* sp., chitinase, xạ khuẩn.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL), cây nhãn được trồng ở tất cả mọi nơi do điều kiện đất đai và khí hậu thuận lợi cho cây nhãn phát triển. Do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu nên việc canh

tác cây nhãn gặp không ít những khó khăn trong đó phải kể đến bệnh thán thư hại cây nhãn. Bệnh thán thư hại nhãn do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra và bệnh có thể gây hại nhiều bộ phận của cây nhãn như lá, chồi non, hoa và trái non. Nấm *Colletotrichum* spp. là loài nấm ký sinh đa ký chủ và bào tử nấm có thể phát tán trong

Người phân biên: TS. Đặng Nguyệt Quế

nước và lan sang những tán lá và trái cây (Agrios, 2005). Để phòng trừ bệnh nông dân thường phun thuốc hóa học vì thế gây ảnh xấu đến sức khỏe của con người và môi trường (Backman *et al.*, 1997). Do đó, việc áp dụng các biện pháp sinh học rất cần thiết để bảo vệ sức khỏe của người nông dân, sức khỏe của người sử dụng và hạn chế ô nhiễm môi trường. Có nhiều nhóm vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh hại cây trồng trong đó xạ khuẩn (Actinomycetes) là nhóm vi sinh vật đang được quan tâm nghiên cứu với những cơ chế nổi bật như có khả năng tiết ra chất kháng sinh (streptomycin, validamycin, kasugamycin, gentamycin...) để ức chế mầm bệnh, có khả năng tiết ra các enzyme ngoại bào như: chitinase, glucanase, cellulase,... nhằm cạnh tranh, ký sinh mầm bệnh để chống lại các tác nhân gây hại cây trồng (Silvia *et al.*, 2008; Palaniyandi *et al.*, 2013). Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng xạ khuẩn có tiềm năng rất lớn trong quản lý bệnh thán thư trên nhiều loại cây trồng như: trên ớt (Đỗ Văn Sử và Lê Minh Tường, 2016), trên xoài (Nguyễn Hồng Quý và Lê Minh Tường, 2016), trên sen (Lê Minh Tường và Đỗ Văn Sử, 2016), trên gấc (Lê Minh Tường, 2014)... Có thể thấy rằng, việc ứng dụng xạ khuẩn để phòng trị bệnh thán thư hại cây nhãn đang là biện pháp có nhiều triển vọng và thân thiện với môi trường.

Trong nhóm vi sinh vật có lợi thì xạ khuẩn là nhóm có triển vọng với những đặc điểm nổi bật như tiết ra nhiều chất kháng sinh, tiết ra các enzyme ngoại bào (chitinase, glucanase, protease, lipase...).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Nguồn nấm *Colletotrichum* sp.: dòng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên nhãn giống IDO thu thập tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp và là dòng có khả năng gây bệnh nặng nhất trong 12 dòng phân lập được.

- Nguồn xạ khuẩn: các chủng xạ khuẩn dùng trong thí nghiệm được phân lập từ đất vườn trồng nhãn của nông dân ở một số tỉnh ĐBSCL. Thu những mẫu đất ở góc của cây nhãn với độ sâu từ 10 - 20 cm ở những vườn khác nhau. Mỗi mẫu đất được cho vào túi nilon riêng và mang về phòng thí nghiệm tiến hành phân lập theo phương pháp của Hsu và Lockwood (1975).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát khả năng đối kháng của xạ khuẩn phân lập từ đất đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại nhãn trong điều kiện phòng thí nghiệm

* Tiến hành thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại. Những chủng xạ khuẩn thí nghiệm được nuôi cấy trong môi trường MS trong 6 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù xạ khuẩn cần dùng là 10^8 CFU/ml. Dòng nấm *Colletotrichum* sp. (gây bệnh thán thư hại nhãn IDO) được nuôi cấy trong môi trường PDA trong 6 ngày.

* Cách thực hiện: khoanh khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp. có đường kính 5 mm được đặt vào giữa đĩa petri có chứa 10 ml môi trường PDA. Khoanh giấy thấm có đường kính 5 mm được tẩm huyền phù các chủng xạ khuẩn thí nghiệm

được đặt đối xứng với khoanh khuẩn ty nấm và cách thành đĩa 1 cm. Ở nghiệm thức đối chứng thì thay khoanh giấy thấm tẩm xạ khuẩn bằng khoanh giấy thấm tẩm nước cất thanh trùng.

* *Chỉ tiêu theo dõi*: đo bán kính vòng vô khuẩn ở các thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Tính hiệu suất đối kháng ở các thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm theo công thức của Palanayandi *et al.* (2013) như sau:

$$\text{HSĐK (\%)} = \frac{\text{BKTNđc} - \text{BKTN} \times k}{\text{BKTNđc}} \times 100$$

Trong đó: BKTNđc: bán kính tản nấm ở nghiệm thức đối chứng.

BKTN × k: bán kính tản nấm ở nghiệm thức chủng xạ khuẩn.

2.2.2. Khảo sát khả năng tiết enzyme chitinase phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn trên môi trường thạch

* *Bố trí thí nghiệm*: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại trong điều kiện phòng thí nghiệm

* *Tiến hành thí nghiệm*: những chủng xạ khuẩn thí nghiệm được nuôi cấy trong môi trường MS trong 6 ngày, xác định mật số và chuyển về huyền phù bào tử xạ khuẩn là 10^8 CFU/ml.

* *Cách thực hiện*: dùng kẹp chuyên dụng cho các khoanh giấy thấm có đường kính 5 mm vào dung dịch huyền phù xạ khuẩn mật số 10^8 CFU/ml. Sau đó, đặt các khoanh giấy thấm lên đĩa petri có chứa 10 ml môi trường chitin agar thành 2 điểm cách đều nhau (mỗi điểm tương ứng 1 khoanh giấy thấm chứa 1 chủng xạ

khuẩn). Sau đó, các đĩa petri thí nghiệm được đặt ở điều kiện nhiệt độ khoảng 28°C. Xác định hoạt tính enzyme chitinase ở từng thời điểm ghi nhận chỉ tiêu bằng cách tráng bề mặt đĩa thạch bằng thuốc nhuộm Lugol (2 g KI + 1 g I₂ + 100 ml nước cất), đổ bỏ phần dung dịch Lugol thừa và tráng bề mặt agar lại với nước.

* *Chỉ tiêu ghi nhận*: đo bán kính vùng không bắt màu thuốc nhuộm Lugol là vòng phân giải chitin ở các thời điểm 3, 5, 7 và 9 ngày sau bố trí thí nghiệm.

2.3. Xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel. Phân tích bằng phần mềm thống kê MSTATC qua phép thử Duncan.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum sp.* gây bệnh thán thư hại nhãn trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả đã phân lập được 105 chủng xạ khuẩn từ đất vườn trồng cây nhãn ở một số tỉnh ĐBSCL. Qua đánh giá nhanh khả năng đối kháng của 105 chủng xạ khuẩn đã chọn được 19 chủng xạ khuẩn thực sự thể hiện khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum sp.* thông qua chỉ tiêu bán kính vòng vô khuẩn (BKVVK) và hiệu suất đối kháng (HSĐK). Khả năng đối kháng của 19 chủng xạ khuẩn với nấm *Colletotrichum sp.* được trình bày ở bảng 1 (BKVVK) và bảng 2 (HSĐK).

* *Bán kính vòng vô khuẩn*: kết quả về bán kính vòng vô khuẩn của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum sp.* gây

bệnh thán thư hại nhân được trình bày ở bảng 1. Ở thời điểm 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm (NSBT), chủng PĐ2-CT có BKVVK là 20,2 mm tuy không khác biệt so với chủng CT17-HG (19,8 mm) nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 5 NSBT, chủng PĐ2-CT vẫn cho BKVVK cao nhất là 10,4 mm, kể đến là 4 chủng BM9-VL, VL7-ĐT, CT35-HG và CT40-HG có BKVVK lần lượt là 8,8 mm; 8,0 mm; 8,4 mm và 8,0 mm

tuy không khác biệt so với chủng CT19-HG (7,8 mm) nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Đến thời điểm 7 NSBT, chủng PĐ2-CT vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao nhất với BKVVK lớn nhất là 8,8 mm; kể đến là 5 chủng BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG và CT40-HG có BKVVK lần lượt là 7,8 mm; 7,8 mm; 7,4 mm; 7,4 mm và 7,6 mm cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại.

Bảng 1. Bán kính vòng vô khuẩn của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. ở các thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

STT	Xạ khuẩn	Bán kính vòng vô khuẩn (mm) ở các thời điểm khảo sát		
		3 NSBT	5 NSBT	7 NSBT
1	BM3-VL	17,8 ^{cd}	6,4 ^{de}	4,6 ^{cde}
2	BM9-VL	18,6 ^{bc}	8,8 ^b	7,8 ^b
3	LV3-ĐT	13,8 ^{ef}	6,6 ^{de}	4,6 ^{cde}
4	LV5-ĐT	12,0 ^{h-k}	6,0 ^{def}	4,0 ^{c-g}
5	LV7-ĐT	11,6 ^{i-l}	8,0 ^b	7,8 ^b
6	LV9-ĐT	12,2 ^{g-k}	5,6 ^{d-g}	2,8 ^{ghi}
7	LV10-ĐT	12,8 ^{f-i}	6,0 ^{def}	3,0 ^{fgh}
8	LV11-ĐT	16,6 ^d	3,2 ^{ij}	4,4 ^{cde}
9	LV15-ĐT	18,6 ^{bc}	6,4 ^{de}	5,4 ^c
10	LV19-ĐT	11,8 ^{ijk}	6,0 ^{def}	3,8 ^{d-g}
11	CT3-HG	12,4 ^{f-j}	5,8 ^{d-g}	3,6 ^{efg}
12	CT4-HG	14,4 ^e	6,4 ^{de}	4,6 ^{cde}
13	CT5-HG	17,6 ^{cd}	6,8 ^{cd}	3,6 ^{efg}
14	CT11-HG	17,8 ^{cd}	6,8 ^{cd}	4,2 ^{cdf}
15	CT17-HG	19,8 ^{ab}	6,4 ^{de}	5,2 ^{cd}
16	CT19-HG	11,4 ^{i-l}	7,8 ^{bc}	7,4 ^b
17	CT35-HG	13,4 ^{e-h}	8,4 ^b	7,4 ^b
18	CT40-HG	9,4 ^m	8,0 ^b	7,6 ^b
19	PĐ2-CT	20,2 ^a	10,4 ^a	8,8 ^a
<i>Mức ý nghĩa</i>		*	*	*
CV (%)		8,00	14,59	26,10

Ghi chú: các số trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan.*: khác biệt ý nghĩa 5%. NSBT: ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

* *Hiệu suất đối kháng*: ở thời điểm 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm, chủng PĐ2-CT có HSDK cao nhất là 41,91%; kế đến là chủng CT17-HG có HSDK là 37,15% tuy không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chủng LV3-ĐT (34,28%) nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 5 NSBT, chủng PĐ2-CT vẫn cho HSDK cao nhất là 47,06%; kế đến là 2 chủng BM9-VL và LV7-ĐT có HSDK lần lượt là 42,94% và 42,36% tuy không khác biệt so với chủng

CT19-HG (40,00%) nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Tại thời điểm 7 NSBT, chủng PĐ2-CT vẫn thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại nhãn thông qua HSDK cao nhất là 57,33%; kế đến là 5 chủng BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG và CT40-HG với HSDK lần lượt là 51,11%; 52,44%; 49,78%; 50,22% và 50,22% cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại.

Bảng 2. Hiệu suất đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. ở các thời điểm 3, 5 và 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

STT	Xạ khuẩn	Hiệu suất đối kháng (%) ở các NSBT		
		3 NSBT	5 NSBT	7 NSBT
1	BM3-VL	26,67 ^e	35,29 ^d	45,78 ^d
2	BM9-VL	24,76 ^{ef}	42,94 ^b	51,11 ^b
3	LV3-ĐT	34,28 ^{bc}	37,06 ^{cd}	42,22 ^{de}
4	LV5-ĐT	16,19 ^h	35,29 ^d	43,55 ^{de}
5	LV7-ĐT	19,05 ^g	42,36 ^b	52,44 ^b
6	LV9-ĐT	13,33 ⁱ	38,24 ^c	42,22 ^{de}
7	LV10-ĐT	13,34 ⁱ	35,29 ^d	40,00 ^e
8	LV11-ĐT	18,10 ^g	16,47 ^f	41,33 ^e
9	LV15-ĐT	29,52 ^d	36,47 ^d	48,00 ^c
10	LV19-ĐT	13,33 ⁱ	37,65 ^{cd}	41,78 ^e
11	CT3-HG	16,19 ^h	36,47 ^d	41,78 ^e
12	CT4-HG	26,67 ^e	31,17 ^e	44,00 ^d
13	CT5-HG	32,38 ^c	38,83 ^c	44,00 ^d
14	CT11-HG	16,19 ^h	36,47 ^d	43,11 ^{de}
15	CT17-HG	37,15 ^b	35,29 ^d	48,00 ^c
16	CT19-HG	15,24 ^h	40,00 ^{bc}	49,78 ^b
17	CT35-HG	27,62 ^e	39,41 ^c	50,22 ^b
18	CT40-HG	9,52 ^j	38,83 ^c	50,22 ^b
19	PĐ2-CT	41,91 ^a	47,06 ^a	57,33 ^a
	<i>Mức ý nghĩa</i>	*	*	*
	CV (%)	18,62	10,13	6,12

Ghi chú: các số trong cùng một cột theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. *: khác biệt ý nghĩa 5%. NSBT: ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Tóm lại, qua kết quả bảng 1 và bảng 2 cho thấy 6 chủng xạ khuẩn PĐ2-CT, BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG và CT40-HG luôn thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại nhãn thông qua bán kính vòng vô khuẩn cao và hiệu suất đối kháng cao và kéo dài đến thời điểm 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm. Do đó, 6 chủng xạ khuẩn trên được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Khả năng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả đánh giá khả năng phân giải chitin của 6 chủng xạ khuẩn (PĐ2-CT, BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG và CT40-HG) được thể hiện qua bảng 3. Ở thời điểm 3 NSBT, cả 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều có khả năng phân giải

chitin, trong đó 2 chủng PĐ2-CT và CT19-HG thể hiện khả năng phân giải chitin cao nhất với bán kính vòng phân giải (BKVPG) lần lượt là 13,50 mm và 12,80 mm lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Ở thời điểm 5 NSBT và 7 NSBT, các chủng xạ khuẩn đều có BKVPG tăng và 2 chủng PĐ2-CT và CT19-HG vẫn cho BKVPG cao nhất lần lượt là 17,13 mm và 16,88 mm (ở thời điểm 5 NSBT); 23,00 mm và 22,13 mm (ở thời điểm 7 NSBT) lớn hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại. Đến thời điểm 9 NSBT, chủng PĐ2-CT thể hiện khả năng phân giải chitin cao nhất thông qua BKVPG lớn nhất là 28,00 mm cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng xạ khuẩn thí nghiệm còn lại.

Bảng 3. Bán kính vòng phân giải chitin của các chủng xạ khuẩn triển vọng ở thời điểm 3, 5, 7 và 9 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Chủng xạ khuẩn	Bán kính vòng phân giải chitin (mm)			
	3 NSBT	5 NSBT	7 NSBT	9 NSBT
LV7-ĐT	10,50 ^b	14,63 ^b	20,25 ^b	23,25 ^c
PĐ2-CT	13,50 ^a	17,13 ^a	23,00 ^a	28,00 ^a
BM9-VL	7,50 ^c	10,63 ^d	15,00 ^d	19,50 ^e
CT19-HG	12,80 ^a	16,88 ^a	22,13 ^a	26,13 ^b
CT35-HG	10,13 ^b	13,63 ^{bc}	18,63 ^c	21,63 ^d
CT40-HG	10,25 ^b	12,88 ^c	18,00 ^c	21,13 ^d
Mức ý nghĩa	**	**	**	**
CV (%)	4,94	3,91	3,85	2,92

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột được theo sau bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt về mặt thống kê qua phép kiểm định Duncan. **: khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%. NSBT: ngày sau khi bố trí thí nghiệm.

Như vậy, qua kết quả ở bảng 3 cho thấy cả 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm đều thể hiện khả năng phân giải chitin với nhiều mức độ khác nhau. Bên cạnh đó, 6 chủng xạ

khuẩn trên cũng thể hiện khả năng đối kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại nhãn thông qua bán kính vòng vô khuẩn cao (bảng 1) và hiệu suất

đổi kháng cao (bảng 2). Khả năng đổi kháng của các chủng xạ khuẩn này có thể được giải thích là do khả năng tiết ra một số enzyme phá vỡ vách tế bào nấm gây bệnh. Thành phần quan trọng trong vách tế bào nấm bệnh chính là chitin nên khi sử dụng các chủng xạ khuẩn này thì enzyme chitinase sẽ phát huy tác dụng phân hủy chitin làm phá vỡ vách tế bào nấm bệnh. Theo Taechowisan *et al.* (2003) cho rằng khả năng ức chế nấm của xạ khuẩn nhờ khả năng tiết enzyme chitinase phá hủy vách tế bào nấm. Enzyme chitinase được sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces hygroscopicus* có khả năng phá hủy và làm biến dạng vách tế bào của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* và *Sclerotium rolfsii* (Prapagdee *et al.*, 2008). Theo Lee *et al.* (2012) đã báo cáo rằng chủng xạ khuẩn *Streptomyces cavourensis* SY224 có khả năng tiết các loại enzyme ngoại bào (chitinase, β -1,3-glucanase, lipase, protease) gây ức chế sự nảy mầm bào tử nấm *Colletotrichum gloeosporioides*.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- 6 chủng xạ khuẩn (PĐ2-CT, BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG và CT40-HG) thể hiện khả năng đổi kháng cao với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại nhãn trong tổng số 105 chủng xạ khuẩn phân lập được trên vùng đất trồng nhãn ở khu vực ĐBSCL.

- Chủng xạ khuẩn PĐ2-CT thể hiện khả năng phân giải chitin cao thông qua bán kính vòng phân giải cao nhất trong số 6 chủng xạ khuẩn thí nghiệm.

4.2. Đề nghị

Đánh giá khả năng phòng trị bệnh thán thư hại nhãn của chủng xạ khuẩn PĐ2-CT ở điều kiện nhà lưới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G.N., 2005. *Plant pathology 5th edition*. San Diego, California: Elsevier Academic Press
2. Backman, P.A., M. Wilson and J.F. Murphy, 1997. *Bacteria for biological control of plant diseases*, In: *Environmentally Safe Approaches to Crop Diseases Control*. Lewis Publishers, Baco Raton, Florida, 95 - 109.
3. Đỗ Văn Sử và Lê Minh Tường, 2016. Hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên cây ớt do nấm *Colletotrichum* sp.. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 28 - 35.
4. Hsu S.C and J.L. Lockwood, 1975. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Apply Microbiology*, 422 - 426.
5. Lê Minh Tường, Đỗ Văn Sử, 2016. Đánh giá khả năng phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên cây sen ở đồng bằng Sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 78 - 84.
6. Lê Minh Tường, 2014. Hiệu quả của xạ khuẩn trong phòng trị bệnh thán thư hại gấc do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra. *Hội thảo Quốc gia về Bệnh hại thực vật Việt Nam*, 238 - 248.
7. Lee, S.Y., H. Tindwa, Y.S. Lee, K.W. Naing, S.H. Hong, Y. Nam and K.Y. Kim, 2012. Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, β -1,3-glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10): 1359 - 1366.
8. Nguyễn Hồng Quý và Lê Minh Tường, 2016. Đánh giá khả năng phòng trị của xạ khuẩn đối với bệnh thán thư trên xoài do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 120 - 127.

9. Palaniyandi, S.A., S.H. Yang, L. Zhang and J.W. Suh, 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97:9621 - 9636.
10. Prapadee B., C. Kuekulvong and S. Mongkolsuk, 2008. Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *International journal of biological sciences*, 4: 330 - 337.
11. Taechowisan, T., N. Chuaychot, S. Chanaphat, A. Wanbanjob and P. Tantiwachwutikul, 2003. Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Colletotrichum musae*. *Biotechnology*, 8(1): 86 - 92.
12. Silvia, D.S. and T.T. Mika, 2008. Friends and foes: *Streptomyces* as modululators of plant disease and symbiosis. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 11 - 19.

ABSTRACT

Assessment of antibacterial activity of actinomycetes isolates on *Colletotrichum* sp. causing anthracnose disease on Longan (*Dimocarpus longan*) in Laboratory condition

The objective of this research was to find out the actinomycetes isolates able to antagonize with Colletotrichum sp. fungus causing anthracnose disease on Longan. One hundred and five actinomycetes isolates were collected from Longan field in some provinces of Mekong Delta. There were 19 of 105 actinomycetes isolates in total presented antagonistic activity against Colletotrichum sp. causing anthracnose disease on Longan and 6 actinomycetes isolates (PĐ2-CT, BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG and CT40-HG) showed higher stabler antagonistic ability with radiuses of inhibition zones reaches 8.8 mm; 7.8 mm; 7.8 mm; 7.4 mm; 7.4 mm and 7.6 mm respectively and antagonistic efficacy reaches 57.33%; 51.11%; 52.44%; 49.78%; 50.22% and 50.22% respectively at 7 days after co-culture. The chitin degradation potential of 6 actinomycetes isolates (PĐ2-CT, BM9-VL, VL7-ĐT, CT19-HG, CT35-HG and CT40-HG) were examined under laboratory conditions with 5 replications and the results indicated that, PĐ2-CT isolate had expressed the chitinolytic activity, with the chitin lyses halo radius of 28.00 mm at 9 days after testing.

Keywords: actinomycetes, anthracnose disease on Longan, *Colletotrichum* sp., chitinase.

PHÁT HIỆN NẤM *Pestalotiopsis* sp. GÂY BỆNH ĐÓM LÁ TRÊN LAN *Dendrobium* spp.

Huỳnh Thị Hồng Phấn^{1,2}, Tôn Thị Kim Thoa^{1,2},
Trần Thị Vân², Võ Thị Thúy Huệ²,
Lê Đình Đôn^{1,2}, Bùi Cách Tuyển²

¹ Khoa Khoa học Sinh học,
Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh
² Phòng Chẩn đoán bệnh cây trồng,
Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường,
Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Dendrobium* tên tiếng Việt là lan hoàng thảo, được Olof Swartz mô tả lần đầu trên Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis vào năm 1799. Chi này có 1148 loài được công nhận, Việt Nam có 107 loài thuộc chi *Dendrobium* phân bố ở các vùng núi từ Bắc vào Nam và một số đảo ven biển. Cây được báo cáo bị tấn công bởi một số loài nấm, gây ra nhiều triệu chứng khác nhau như bạc lá, đốm lá, thối thân, gỉ sắt và bạc lá hoa. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra tác nhân gây bệnh trên lan thuộc về các chi nấm *Fusarium* (gây bệnh đốm vàng, hội chứng héo), *Colletotrichum* (gây bệnh thán thư), *Phytophthora* (gây bệnh đốm lá, loét thân), *Alternaria* (gây bệnh thối đen, đốm đen) (Sarsaiya và ctv., 2019; Agrios, 2005). Ở nghiên cứu này, nấm *Pestalotiopsis* sp. được phát hiện là tác nhân gây bệnh đốm nâu trên lá cây lan. Chi nấm này được báo cáo là gây bệnh đốm lá trên *Codiaeum variegatum*

(Khalilabad và ctv., 2022), bệnh đốm lá xám trên *Cocos nucifera* L. (Bhuiyan và ctv., 2021), đốm lá trên *Sorghum bicolor* (Fan và ctv., 2021) và các bệnh thối nhũn, chết chồi, cháy ngọn và bệnh trên trái sau thu hoạch. Dựa trên giá trị kinh tế mà lan này mang lại, mục đích nghiên cứu là tìm hiểu về tác nhân gây bệnh đốm lá cho *Dendrobium* spp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu thập nguồn mẫu cho nghiên cứu

Khảo sát 30 cây lan *Dendrobium* spp. từ tháng 10/2022 đến 3/2023 ở vườn lan tại thành phố Hồ Chí Minh (10°55'08.2"N 106°40'05.2"E). Triệu chứng bệnh là những đốm tròn màu nâu đen đến đen, có quầng vàng xung quanh, đôi khi nhiều đốm xuất hiện tạo thành cụm và gây biến dạng bề mặt lá. Lá có đốm bệnh được làm sạch với giấy thấm, cắt thành 2 - 3 mảnh (4 cm²/mảnh), khử trùng các mảnh cắt với Ethanol 70° trong 30 giây và NaClO 1% trong 2 phút. Tiếp tục rửa qua ba lần nước vô trùng, cắt nhỏ thành mảnh 1 cm², làm khô và đặt lên đĩa thạch WA. Sau 3 ngày,

Người phân biện: PGS.TS. Trịnh Xuân Hoạt

cắt khối thạch nấm tại vùng phát triển đặt sang môi trường PDA, ủ ở 25°C trong điều kiện tối. Sau 7 ngày, chọn các mẫu nấm tương đồng về hình thái của *Pestalotiopsis* sp., bảo quản trên PDA nghiêng ở 10°C và ống cryo tube 1,5 ml.

2.2. Nhận diện hình thái các mẫu nấm phân lập

Các chủng nấm được quan sát và nhận diện dựa trên kích thước và hình dạng bào tử, kích thước và số lượng phân phụ đáy và đỉnh, số lượng vách ngăn và màu sắc các tế bào trung tâm của bào tử. Các hình thái vi thể được quan sát bằng phương pháp ủ nấm trên lame (McKenzie, 2008) và các tài liệu tham khảo của Zhang và cộng sự (2021).

2.3. Kiểm tra khả năng gây bệnh

Thử nghiệm trên cây lan sạch bệnh lấy từ cây mô khỏe mạnh theo chu trình của Koch. Huyền phù bào tử 10^6 bào tử/ml được chuẩn bị từ tản nấm 7 ngày tuổi. Cây được vệ sinh sạch và khử trùng bề mặt bằng Ethanol 70° trong 30 giây. Sử dụng ống tiêm vô trùng đường kính kim 0,7 mm để tạo vết thương trên lá (3 điểm/lá). Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên gồm 3 nghiệm thức, (1) nghiệm thức có vết thương (chúng 4 cây với 5 μ l huyền phù bào tử/điểm chủng), (2) nghiệm thức không có vết thương (chúng 4 cây với 5 μ l huyền phù bào tử/điểm chủng), (3) nghiệm thức đối chứng có và không có vết thương (chúng 2 cây với 5 μ l nước cất vô trùng/điểm chủng). Đặt các hộp chủng được tạo lỗ thoát khí và giữ ẩm bằng nước cất vô trùng 12 giờ sáng tối, 25°C. Theo

đôi các triệu chứng trong vòng 30 ngày. Tỷ lệ vết bệnh (TLVB, %) = số điểm chủng có triệu chứng/tổng điểm chủng. Lá có điểm bệnh được nhuộm mô học (Chia-Lin và ctv., 2010) để quan sát các đặc điểm cấu trúc khi nấm xâm nhiễm.

2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của nấm *Pestalotiopsis* sp.

Môi trường PDA được chọn để ủ trong tối ở các khoảng nhiệt độ 15°C, 20°C, 25°C, 30°C và 35°C. Phép đo sự sinh trưởng được thực hiện bằng trung bình 2 phép đo mỗi nửa đĩa với 3 đĩa lặp lại.

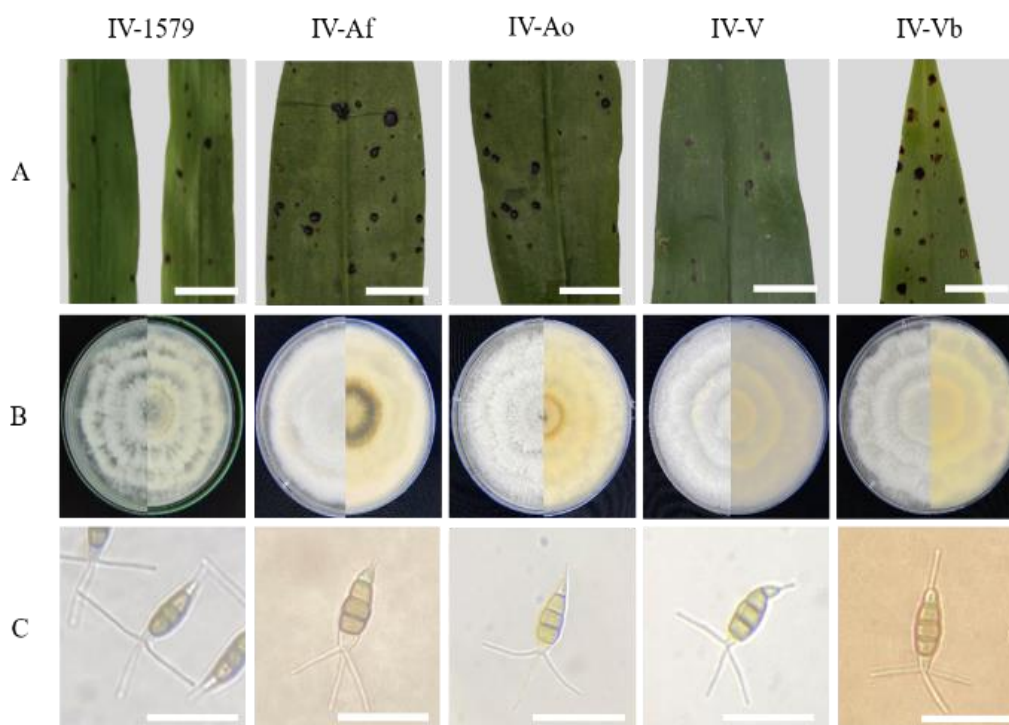
2.5. Xử lý số liệu

Phần mềm minitab 2010 được sử dụng để phân tích thống kê. Dữ liệu được sắp xếp trong Microsoft Office Excel 2010. Sử dụng thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên và dữ liệu được phân tích phương sai một chiều với $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái *Pestalotiopsis* sp.

Dựa trên đặc điểm hình thái, năm chủng phân lập IV-1579, IV-Af, IV-Ao, IV-V, IV-Vb đã được xác định là nấm *Pestalotiopsis* sp. Triệu chứng bệnh là các vết đốm lá đặc trưng bởi các đốm nâu đen đến đen, có dạng hình tròn đến oval, đôi khi hình dạng không xác định. Kích thước vết đốm 2 - 5 mm, thường có quầng vàng nhạt bao quanh, phần trung tâm đôi khi lõm xuống hoặc lồi lên. Mặt sau có thể có các mảng trắng bao quanh đốm (hình 1A).



Hình 1. Triệu chứng bệnh đốm lá và đặc điểm hình thái *Pestalotiopsis* sp.

(A: đốm lá trên *Dendrobium* spp., thanh bar = 1 cm. B: tản nấm hình cánh hoa có vòng sinh trưởng gọn sóng (PDA, 7 ngày). C: bào tử dạng bầu gồm 3 tế bào trung tâm màu vàng nâu, tế bào đáy và tế bào đỉnh có các phần phụ trong suốt, thanh bar = 25 μ m, 40X.

Trung bình tản nấm đạt đường kính 90 mm sau 6 - 8 ngày trên môi trường PDA ở 25°C trong điều kiện tối. Mặt trên tản nấm có ba vòng sinh trưởng gọn sóng màu trắng kèm theo các túi dịch bào tử màu đen tại phần thấp hơn, mặt dưới tản

nấm có màu vàng nhạt (hình 1B). Trung bình đường kính tản nấm đạt $37 \pm 2,6$ mm sau 3 ngày đầu, từ ngày thứ tư sinh trưởng thêm $7,4 \pm 2,9$ mm/ngày, chủng IV-Af và IV-Vb có tốc độ sinh trưởng nhanh nhất (bảng 1).

Bảng 1. Tốc độ sinh trưởng của nấm trên PDA và kích thước bào tử

Chủng nấm	Tốc độ sinh trưởng (mm/ngày)	Kích thước bào tử (n = 30, μ m)
IV-1579	$8,0 \pm 1,5$	$20,6 \pm 2,4 \times 6,9 \pm 1,2$
IV-Af	$6,5 \pm 0,8$	$20,7 \pm 2,6 \times 6,4 \pm 0,7$
IV-Ao	$8,0 \pm 1,3$	$21,2 \pm 1,8 \times 7,6 \pm 1,4$
IV-V	$8,1 \pm 1,3$	$21,0 \pm 1,8 \times 7,4 \pm 1,4$
IV-Vb	$6,2 \pm 0,4$	$22,3 \pm 2,8 \times 6,4 \pm 1,3$

Bảng 2. Tỷ lệ phát bệnh và đường kính vết bệnh nhân tạo

	CVT		KVT	
	7 NSC	14 NSC	7 NSC	14 NSC
TLVB (%)	25%	100%	0%	42%
ĐKTB (mm)	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,2

Các túi dịch bào tử có hình cầu đến quả lê, nửa chìm trong giọt tiết trong suốt, kích thước 100 - 550 μm (n = 30). Các túi dịch bào tử này hình thành tại rìa của vòng sinh trưởng, xuất hiện từ ngày thứ 13 - 21

(hình 2). Bào tử của chủng IV-1579 xuất hiện sớm nhất, trong khi bào tử của chủng IV-V và IV-Vb xuất hiện muộn nhất, sau 21 ngày cấy.

**Hình 2. Đặc điểm hình thái chủng IV-1579**

(a: tần nấm hình cánh hoa có vòng sinh trưởng gợn sóng (PDA, 14 ngày).
b: túi dịch bào tử màu đen thanh bar = 500 μm . C: sợi nấm trong suốt, phân nhánh, không có vách ngăn.
d: Conidiogenous. E: bào tử và các hạt bào tử hình cầu.
c - e: nhuộm với trypan-blue 0,02%, thanh bar = 25 μm)

Sợi nấm trong suốt, không có vách ngăn, đường kính $3,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$ (n = 30). Thể bình kết thành cụm, bị tiêu giảm thành các bào tử vô tính, tế bào phụ hình trụ, rời rạc, thành mỏng (hình 2). Bào tử của nấm chủng dạng hình bầu gồm năm tế bào ngăn cách bởi vách ngăn mỏng, với ba tế

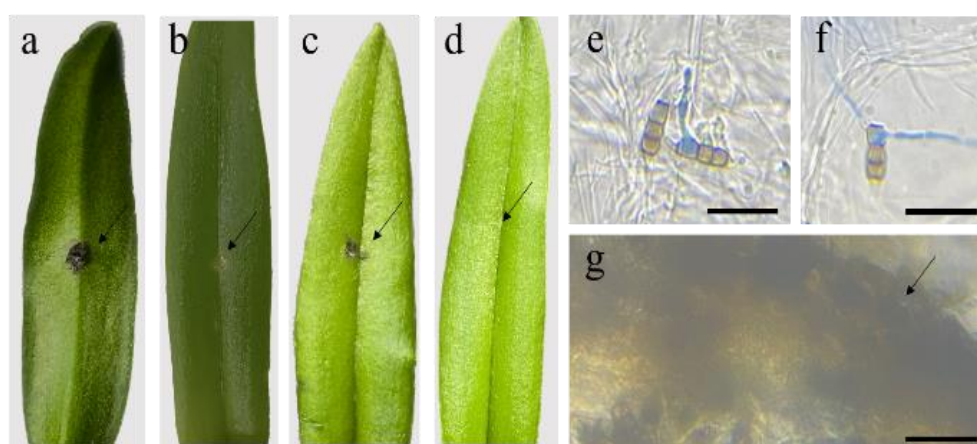
bào trung tâm có màu vàng nâu (IV-1579 có hai tế bào ở dưới tối hơn trong khi các chủng còn lại có màu tế bào trung tâm đồng nhất), một tế bào đỉnh hình nón và tế bào đáy trong suốt có đỉnh phụ hình ống (hình 1C). Bào tử nấm chủng có kích thước trung bình $21,2 \pm 0,7 \times 7 \pm 0,7 \mu\text{m}$,

tế bào đỉnh có duy nhất một phần phụ ($6,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$, $n = 50$), phần tế bào đáy có đỉnh hai đến ba phần phụ hình ống, đa số là ba ($15,3 \pm 10,0 \mu\text{m}$, $n = 50$). Không tìm thấy chlamydospores.

3.2. Kiểm tra khả năng gây bệnh

Chủng IV-1579 có thời gian sinh bào tử sớm nhất và được chọn để kiểm tra khả năng gây bệnh. Tất cả các thử

thử nghiệm có vết thương (CVT) đều có triệu chứng điển hình của bệnh đốm lá. Ban đầu là những vết bệnh có nước, phồng nhẹ xung quanh vết thương nhân tạo, sau đó đường kính vết bệnh lớn dần và tạo thành các vết đốm đen đường kính trung bình (ĐKTB) 2,2 mm ở 14 ngày sau chủng (NSC). Các thử nghiệm không vết thương (KVT) cho tỉ lệ nhiễm bệnh là 42% ở 14 NSC (bảng 2).



Hình 3. Thử nghiệm kiểm tra phát bệnh đối với chủng IV-1579 sau 14 ngày

(a: đốm đen trên lá CVT. B: đối chứng CVT. C: đốm đen có quang vàng nhạt trên lá KVT. d: đối chứng KVT. E - f: hình thành ống mầm từ tế bào trung tâm thứ ba của bào tử. g: ổ bào tử màu nâu sẫm dưới lớp biểu bì. Thanh bar = $25\mu\text{m}$)

Bào tử nấm *Pestalotiopsis* sp. nảy mầm trên bề mặt của lá ký chủ, hình thành một ống mầm từ tế bào trung tâm thứ ba (hình 3e), đôi khi có hai ống mầm được hình thành (hình 3f). Ở chủng IV-1579, tế bào trung tâm thứ ba này có màu vàng nâu nhạt hơn các tế bào còn lại. Sau đó, các ống mầm này nhanh chóng phát triển thành sợi nấm, xuyên qua lớp biểu bì và gắn kết với các sợi nấm khác, hình thành ổ bào tử màu nâu nhạt đến nâu sẫm (hình 3g). Tại thời điểm này, vết bệnh màu nâu đen đến đen có thể quan sát dễ dàng trên bề mặt lá (ở cả mặt trước và sau). Các ổ bào tử

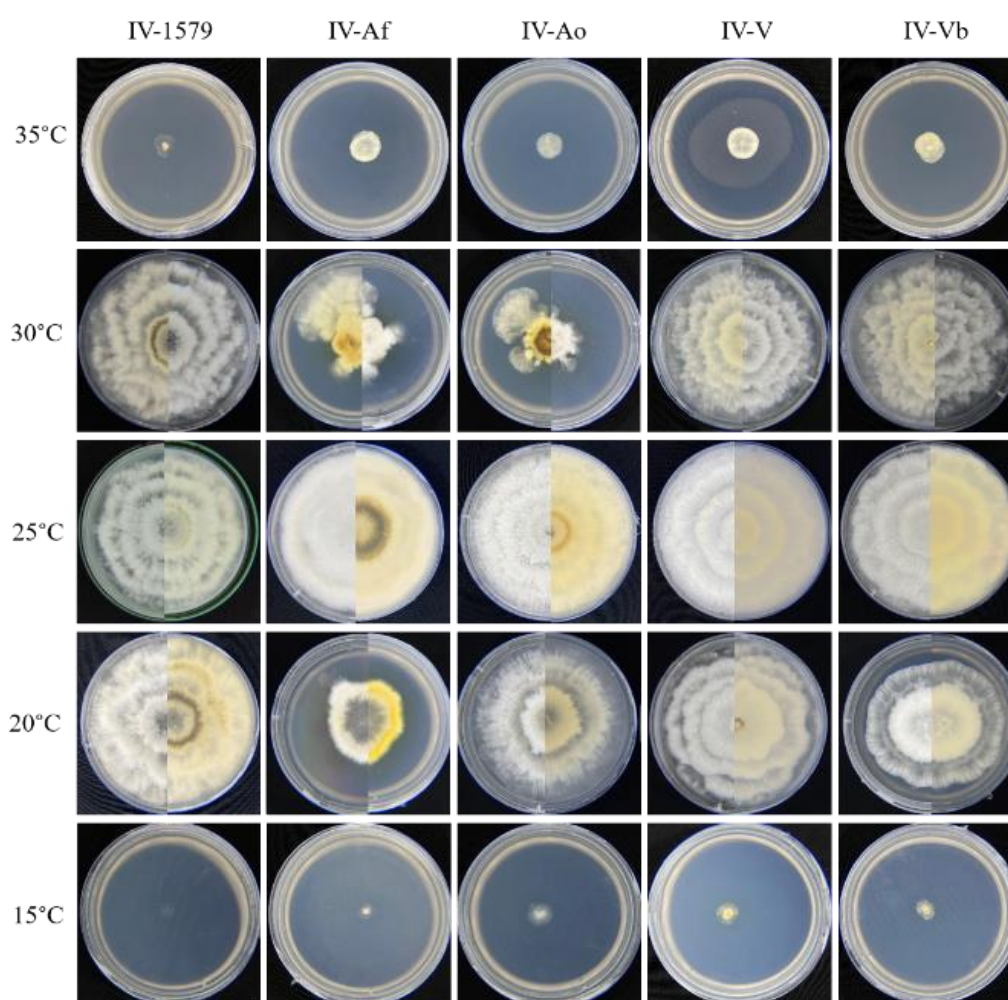
hình thành nhiều hơn và chuyển sang màu đen, các bào tử mới được hình thành và bắt đầu chu kỳ sinh trưởng mới, lúc này bề mặt của vết bệnh có thể biến đổi nhẹ, lớp biểu bì lõm xuống hoặc lồi lên. Các chủng nấm tái phân lập từ vết bệnh có triệu chứng bệnh tương đồng với đặc điểm hình thái của chủng *Pestalotiopsis* sp. đã sử dụng để gây bệnh.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của nấm *Pestalotiopsis* sp.

Các chủng nấm sinh trưởng tối đa ở 25°C , với đường kính tản nấm đồng nhất

(85 mm), tất cả các tản nấm có ba vòng đồng tâm gọn sóng. Nhiệt độ phù hợp tiếp theo là 20°C, với bốn trong năm chủng đạt đường kính từ 78 đến 85 mm, chủng IV-Af chỉ đạt 44 mm. Ở nhiệt độ này, chủng IV-Ao, IV-Af và IV-V xuất hiện túi dịch bào tử sau từ 4 đến 5 ngày trên môi trường PDA. Nhiệt độ phù hợp tiếp theo là 30°C với tốc độ sinh trưởng thấp hơn đáng kể là chủng IV-Af (60 mm) và IV-Ao (46 mm), các chủng còn lại đạt 85 mm. Ở 35°C, các chủng sinh trưởng

rất kém giai đoạn đầu, sau đó sinh trưởng mạnh về chiều cao, nhô lên mặt thạch với các sợi nấm đan chặt vào nhau, các chủng có tốc độ sinh trưởng tương tự nhau (11 - 12 mm), chủng IV-Af xuất hiện túi dịch bào tử. Không nhận thấy sự sinh trưởng của nấm ở 15°C. Ở 20°C và 30°C, các chủng nấm xuất hiện túi dịch bào tử sớm hơn so với ở các điều kiện nhiệt độ khác, mặt sau của tản nấm có màu tương đối đậm hơn và vòng sinh trưởng ít gọn sóng hơn.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của nấm *Pestalotiopsis* sp. (PDA, 7 ngày). Sự sinh trưởng tối đa và đồng đều ở 25°C, tiếp đến ở 20°C và sự sinh trưởng kém nhất ở 15°C.

3.5. Thảo luận

Sự sinh trưởng của phong lan bị ảnh hưởng bởi các tác nhân sinh học và phi sinh học khác nhau. Khảo sát vườn lan tại thành phố Hồ Chí Minh cho thấy phần lớn cây bị bệnh đốm lá và thối thân. Bệnh đốm lá xuất hiện trên hầu hết các lá của cây lan *Dendrobium* spp. và các loài lan khác.

Trong nghiên cứu này, nấm chủng nấm có đặc điểm tương tự *Pestalotiopsis* sp. được phân lập từ các cây lan *Dendrobium* spp. có triệu chứng đốm lá và được nhận diện bởi đặc điểm hình thái học. Chi *Pestalotiopsis* được Steyaert mô tả lần đầu tiên vào năm 1949, ở những năm sau đó, dựa trên đặc điểm cấu tạo bào tử, Steyaert đã chia *Pestalotia* thành 3 chi là *Pestalotia* (bào tử 6 tế bào), *Pestalotiopsis* (bào tử 5 tế bào) và *Truncatella* (bào tử 4 tế bào). Trong nghiên cứu này, bào tử của cả năm chủng nấm đều là thể nấm tế bào có ba tế bào trung tâm có sắc tố, hai đến ba phần phụ ở đỉnh phát sinh từ đỉnh của tế bào đỉnh hình nón, một phần phụ ở đáy. Các đặc điểm hình thái này của năm chủng phân lập rất phù hợp với mô tả về *Pestalotiopsis* sp. do Bhuiyan và cộng sự cung cấp (2021).

Thử nghiệm kiểm tra khả năng gây bệnh đã khẳng định *Pestalotiopsis* sp. là tác nhân gây bệnh đốm lá trên *Dendrobium* spp.

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh của nấm. Tốc độ sinh trưởng tối đa của *Pestalotiopsis* sp. được quan sát thấy ở 25°C, tuy nhiên, sự sinh trưởng yếu và ngừng ở nhiệt độ thấp nhất (15°C) và cao nhất (35°C). Kết quả này cho thấy *Pestalotiopsis* sp. rất thích hợp với điều

kiện khí hậu nhiệt đới và sự phát triển của bệnh có khả năng bị ức chế ở nhiệt độ cực cao và cực thấp.

4. KẾT LUẬN

Pestalotiopsis sp. lần đầu tiên được xác định là tác nhân gây bệnh đốm lá trên *Dendrobium* spp. thu thập tại thành phố Hồ Chí Minh. Nấm *Pestalotiopsis* này được nhận diện bởi hình thái đại thể và hình thái vi thể trên môi trường nuôi cấy PDA. *Pestalotiopsis* sp. phát triển tốt nhất ở 25°C trong điều kiện tối.

Bệnh đốm lá do *Pestalotiopsis* sp. gây ra có triệu chứng là các đốm nâu đen đến đen. Sau 14 ngày gây bệnh nhân tạo, đường kính vết bệnh đạt $2,2 \pm 0,2$ mm (gây bệnh có vết thương) và $1,8 \pm 0,2$ mm (gây bệnh không vết thương).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.
2. Bhuiyan, M. A. B., Sultana, N., Mahmud, N. U., Kader, M. A., Hassan, O., Chang, T.,... & Akanda, A. M. (2021). *Characterization of Pestalotiopsis sp. causing gray leaf spot in coconut (Cocos nucifera L.) in Bangladesh*. Journal of basic microbiology, 61: 1085 - 1097.
3. Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P.W. (2014). *Pestalotiopsis revisited*. Studies in Mycology, 79:121 - 186.
4. Sarsaiya, S., Shi, J., & Chen, J. (2019). *A comprehensive review on fungal endophytes and its dynamics on Orchidaceae plants: current research, challenges, and future possibilities*. Bioengineered, 10:316 - 334.
5. Zhang X, Yang Y, Li S, Yan K, Li X. (2021). *First report of leaf spots on Gentiana rhodantha caused by Pestalotiopsis trachycarpicola*. Journal of General Plant Pathology, 87:316 - 321.

ABSTRACT

Dendrobium orchid is one of the most important ornamental plants in Asia, which has high economic value due to its attractive, vibrant, and amazing distinctive features. This study aimed to isolate and characterize the causal agents of leaf spot disease in Dendrobium spp. plants. The fungal isolates were characterized based on the morphological features of the artificial media and the pathogenicity tests on the healthy Dendrobium spp. leaves. The results suggested that Pestalotiopsis sp. was the causal agent to attack Dendrobium spp. leaves. The conidia of five isolates of Pestalotiopsis sp. were ellipsoid, slightly curved, basal cell obconic to hemispherical, average size of median cells around $21,2 \pm 0,7 \times 7 \pm 0,7 \mu\text{m}$. The apical cell was recorded with smooth wall, conical, hyaline, $15,3 \pm 10,0 \mu\text{m}$ long, having 2 - 3 (mostly 3) concurrent tubular apical appendages, filiform and the single basal appendage with $6,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$ long, straightly. The isolate IV-1579 was inoculated on healthy Dendrobium spp. leaves, and the leaf spot symptoms were recorded after seven days of inoculation. The optimum temperature for Pestalotiopsis sp. was 25°C , however, the growth of Pestalotiopsis sp. was inhibited at 15°C or 35°C . These results indicated that Pestalotiopsis sp. caused the leaf spot disease on Dendrobium orchid, it is needed to control as well.

Keywords: *Dendrobium orchid, bệnh đốm lá, Pestalotiopsis sp.*

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN NẤM CÓ ÍCH TRONG ĐẤT TRỒNG CÂY CÔNG NGHIỆP

Ngô Công Hậu¹, Võ Thị Ngọc Quyên², Trần Giang Đại Nghĩa²,
Trần Thị Vân³, Nguyễn Ngọc Linh⁴, Trần Đức Thắng⁴, Lê Đình Đôn²

¹ Phòng Quản lý Chất lượng, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

² Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

³ Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường,
Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

⁴ Trung tâm Nghiên cứu - Phát triển,

CN Công ty Cổ phần Phân bón Dầu khí Cà Mau

TÓM TẮT

Sử dụng các sản phẩm sinh học từ vi sinh vật để thay thế một phần thuốc hoá học đáp ứng nguồn lương thực an toàn và bảo vệ môi trường sống. Nhằm chọn lọc những mẫu nấm có ích, nghiên cứu đã thu được 111 mẫu đất nông nghiệp trồng cây tiêu, chuối, cà phê và chè ở Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Đắk Nông, Lâm Đồng và Long An. Kết quả phân lập được 33 mẫu nấm thuộc các chi *Penicillium*, *Purpureocillium*, *Aspergillus* và *Cladosporium*. Bằng phương pháp định danh hình thái và giải trình tự gen vùng ITS1F-ITS4, thu được 6 mẫu nấm thuộc loài *Penicillium menonorum* chỉ hiện diện ở đất trồng chuối tại tỉnh Long An; 13 mẫu thuộc loài *Purpureocillium lilacinum* và 10 mẫu thuộc loài *Aspergillus allahabadii* hiện diện trên các vườn cây trồng hồ tiêu, chuối và cà phê; 4 mẫu nấm còn lại thuộc loài *Cladosporium tenuissimum* hiện diện trong đất trồng hồ tiêu, chè, chuối ở cả 3 tỉnh Bình Thuận, Lâm Đồng, Long An. Một số mẫu phân lập thuộc nhóm PGPR (plant growth promoting rhizosphere) có tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp hữu cơ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc phát triển cây công nghiệp còn gặp rất nhiều khó khăn do khí hậu nước ta có nhiều biến đổi, việc trồng trọt phụ thuộc rất nhiều vào tự nhiên. Bên cạnh đó, bệnh hại cây trồng gây thiệt hại mùa màng, làm giảm năng suất và chất lượng nông sản. Bệnh hại chủ yếu trên một số cây công nghiệp đều thuộc nhóm dịch hại lây lan trong đất và cây giống, triệu chứng dễ

nhầm lẫn và khó phòng trừ. Vì vậy đề tài được đặt ra nhằm xác định thành phần nấm có ích hiện diện ở các vùng cây trồng công nghiệp ở một số tỉnh, thành tại Việt Nam nhằm ứng dụng trong công tác bảo vệ thực vật ở nhiều vùng cây trồng khác nhau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 111 mẫu đất được thu thập tại các vườn hồ tiêu, chuối, cà phê và chè

Người phân biên: TS. Võ Thị Thu Oanh

thuộc các tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Đắk Nông, Lâm Đồng, Long An. Mẫu được lấy ở độ sâu 0 - 30 cm, 5 điểm được lấy trên một vườn cây và trộn đều thành một mẫu đại diện. Sau đó mẫu được đựng trong túi PE kèm theo phiếu ghi tên, địa chỉ vườn, vị trí vườn, số thứ tự và ngày lấy mẫu. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng và được xử lý trong khoảng thời gian ngắn nhất.

2.2. Phân lập nấm từ mẫu đất

Lắc 10 g đất trong 90 ml nước cất khử trùng khoảng 20 phút. Pha loãng theo các nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Trãi 50 - 100 μ l dịch pha loãng lên môi trường PGA với 5 lần lặp lại cho mỗi nồng độ. Sau đó tiến hành làm thuần theo phương pháp đơn bào tử.

2.3. Định danh hình thái các mẫu nấm

Quan sát đặc điểm hình thái nấm sợi bằng phương pháp của Agrios (2005).

Hình thái đại thể: các dòng nấm phân lập được sẽ được cấy điểm trên tâm đĩa môi trường PGA và được ủ từ 1 - 4 tuần. Quan sát và mô tả các đặc điểm: tốc độ phát triển, hình dáng, màu sắc mặt trên và mặt dưới tản nấm, màu sắc của môi trường do sắc tố nấm sợi tạo ra.

Hình thái vi thể: cắt một khối thạch (1×1 cm) PGA mỏng đặt lên lam kính vô trùng ở giữa đĩa petri trên 1 lớp giấy ẩm vô trùng, cấy nấm vào 4 mặt bên của khối thạch, đẩy lamelle lên. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng từ 2 - 3 ngày. Sau đó lấy lamelle đặt lên một lam kính sạch có sẵn một giọt

nước khử trùng. Quan sát mẫu dưới kính hiển vi ở vật kính 40X mô tả các đặc điểm: sợi nấm có hay không có sự phân nhánh và vách ngăn; hình dạng cành bào tử; đặc điểm hình dạng, màu sắc, kích thước thể bình và bào tử.

2.4. Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

DNA tổng số được ly trích và thực hiện phản ứng PCR để khuếch đại vùng Internal transcribed spacer (ITS) với cặp mồi ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3') và ITS4 (5' - TCC TCC.

GCT TAT TGA TAT GC - 3') (White và *ctv.*, 1990). Chu trình nhiệt bao gồm 95°C - 3 phút (1 chu kỳ); 35 chu kỳ lặp lại với 95°C - 35 giây, 59°C - 35 giây, 72°C - 35 giây và 72°C - 35 giây (1 chu kỳ) và 72°C - 7 phút (1 chu kỳ). Thể tích hỗn hợp phản ứng là 12,5 μ L bao gồm: 6,25 μ L MyTaqTM Mix 2X; 0,4 μ L mỗi primer (10 pmol/ μ L); 4,45 μ L H₂O nuclease - free water; 1 μ L DNA mẫu (50 ng/ μ L).

Các sản phẩm DNA đã khuếch đại sau khi được kiểm tra sẽ gửi đến Công ty Nam Khoa (Việt Nam) để giải trình tự.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả phân lập các mẫu nấm

Từ 111 mẫu đất được thu thập tại các vườn trồng cây công nghiệp tiến hành phân lập trên môi trường PGA đã thu được 108 mẫu nấm. Trong đó 33 mẫu nấm dựa theo khoá phân loại của Raper

và Fennell (1965), Luangsa-ard và ctv., (2011), Bensch (2012), Visagie (2014) được chia thành 4 nhóm tại bảng 1 và được nghi ngờ là những mẫu nấm có ích đối với cây trồng. Nhóm 2 với tỉ lệ xuất hiện cao nhất và là các mẫu được thu thập tại Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Đắk Nông và Long An trên các vườn trồng hồ tiêu và chuối. Trong đó chuối là cây ký chủ chủ yếu ở cả 4 nhóm.

3.2. Kết quả xác định các mẫu nấm dựa vào đặc điểm hình thái

Dựa vào hình thái của tản nấm trên môi trường PGA sau 14 - 21 ngày các đặc điểm về sợi nấm, cành bào tử, thể bình và bào tử được quan sát dưới vật kính 40X, đặc điểm hình thái của các mẫu nấm được mô tả trong hình 1 và bảng 2.

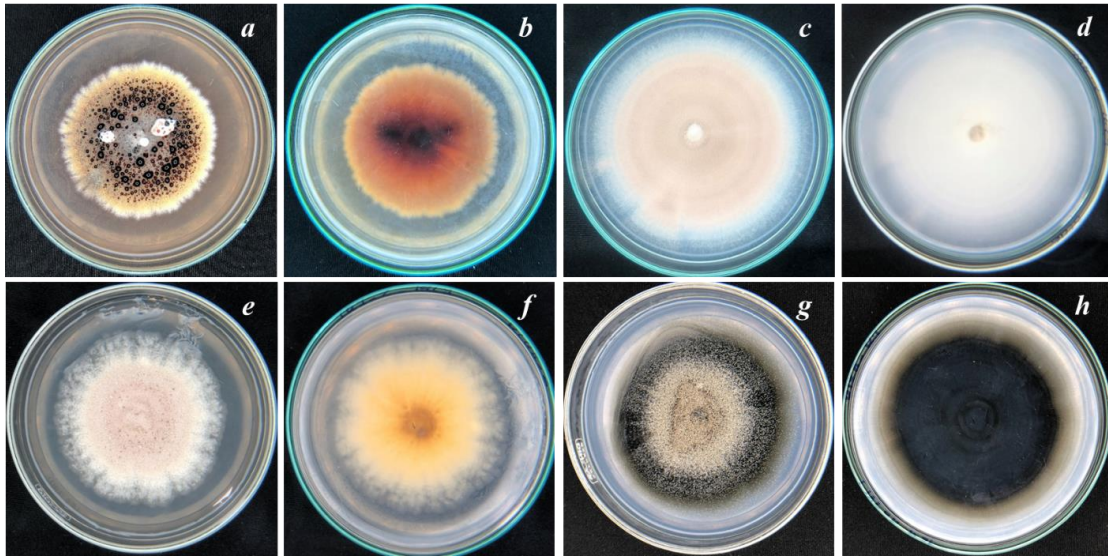
Các mẫu nấm thuộc nhóm 1 và nhóm 3 có tản nấm phát triển chậm với tốc độ trung bình mỗi ngày lần lượt là $2,05 \pm$

$0,74$ mm và $2,19 \pm 0,81$ mm. Trong đó nhóm 1 đạt đường kính 37 mm sau 14 ngày, tản nấm có hình tròn, rìa răng cưa, mặt trên màu nâu với nhiều giọt tiết nâu đen, mặt dưới có màu vàng nâu. Mẫu nấm nhóm 3 đạt đường kính 39 mm sau 14 ngày với tản nấm hình tròn, rìa răng cưa, mặt trên có màu từ hồng, mặt dưới màu vàng nâu.

Mẫu nấm nhóm 2 và nhóm 4 phát triển khá nhanh với tốc độ trung bình lần lượt là $4,5 \pm 2,0$ mm và $4,6 \pm 0,9$ mm. Trong đó nhóm 2 đạt đường kính 74 mm sau 14 ngày, tản nấm tròn, rìa nguyên, nhiều vòng đồng tâm, màu sắc thay đổi từ trắng đến tím khi sinh bào tử, sợi nấm ở tâm và rìa có màu trắng, mặt dưới màu xám. Mẫu nấm nhóm 4 đạt đường kính 66 mm sau 14 ngày với tản nấm tròn, rìa nguyên, mặt trên màu nâu đen, mặt dưới màu đen.

Bảng 1. Phân loại các mẫu nấm phân lập theo đặc điểm hình thái

Nhóm	Tản nấm		Số mẫu	Tỉ lệ xuất hiện	Địa điểm	Cây ký chủ
	Mặt trên	Mặt dưới				
1	Nâu	Vàng nâu	6	18,18%	Long An	Chuối
2	Tím	Xám	13	39,40%	Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Đắk Nông, Long An	Hồ tiêu, chuối, cà phê
3	Hồng	Vàng nâu	10	30,30%	Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Đắk Nông, Long An	Hồ tiêu, chuối, cà phê
4	Nâu đen	Đen	4	12,12%	Bình Thuận, Lâm Đồng, Long An	Cà phê, chè, chuối
Tổng			33			



Hình 1. Hình thái mặt trên và mặt dưới tản nấm
(a - b: nhóm 1; c - d: nhóm 2; e - f: nhóm 3; g - h: nhóm 4)

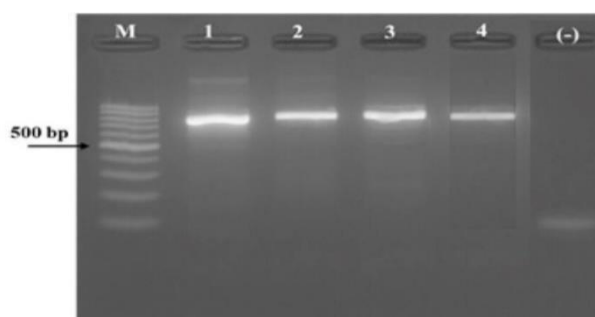
Bảng 2. Kết quả xác định các mẫu nấm dựa vào đặc điểm hình thái

Nhóm	Đặc điểm hình thái trên môi trường PGA				Kết quả phân lập
	Sợi nấm	Cành bào tử	Thể bình	Bào tử	
1	Trong suốt, không có vách ngăn	7,4 - 12,2 x 1,7 - 2,3 μm , mọc thẳng, không phân nhánh	4,7 - 5,8 x 2,0 - 2,5 μm , hình bình, phình to ở đáy và nhỏ dần về phía đầu, mọc thành cụm 2 - 5 cái	2,7 - 3,2 x 2,5 - 2,9 μm , hình cầu, mọc thành chuỗi dài	<i>Penicillium</i> sp. (Visagie, 2014)
2	Trong suốt, phân nhánh, có vách ngăn	5,8 - 10,3 x 2,6 - 3,1 μm .	5,6 - 6,8 x 2,7 - 3,2 μm , hình bình ngắn, phình to ở giữa nhỏ dần về phía đầu, mọc thành cụm 2 - 4 cái	2,9 - 3,3 x 2,3 - 2,7 μm , hình cầu hoặc hơi nhọn ở hai đầu mọc thành chuỗi dài	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Luangsa-ard và ctv., 2011)
3	Trong suốt, mọc thẳng	-	5,3 - 7,6 x 2,0 - 2,7 μm , mọc ở đỉnh sợi nấm thành cụm dày đặc tạo hình rổ quạt	2,6 - 3,0 x 2,5 - 2,9 μm , hình cầu, trong suốt, mọc thành chuỗi	<i>Aspergillus</i> sp. (Raper và Fennell, 1965)
4	Rộng 3,3 - 4,3 μm , phân nhánh, có vách ngăn, thường bị thất lại ở vách ngăn	Hình trụ thon dài gần giống sợi nấm, có vách ngăn	-	Nhiều hình dạng khác nhau: hình elip 4,8 - 7,0 x 2,9 - 3,6 μm , không có vách ngăn; và hình trụ 9,4 - 14,6 x 4,0 - 4,8 μm , đôi khi không hoặc có 1 vách ngăn	<i>Cladosporium</i> sp. (Bensch và ctv., 2012)

3.3. Kết quả xác định các mẫu nấm dựa vào giải trình tự gen vùng rDNA-ITS

Các mẫu nấm sau khi được xác định là *Penicillium* sp. (nhóm 1), *Purpureocillium lilacinum* (nhóm 2), *Aspergillus* sp. (nhóm 3), *Cladosporium* sp. (nhóm 4) nhờ vào đặc điểm hình thái sau đó được định danh chính xác tên loài dựa vào giải trình tự vùng ITS. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, vùng ITS có cùng chiều dài khoảng 650 bp (hình 2). Sau đó, sản phẩm PCR đã được giải trình tự trực tiếp với cặp mồi ITS1F-ITS4 được xác định có chiều dài từ 550 - 600 bp.

Bốn mẫu sau khi được giải trình tự tại Công ty Nam Khoa (Việt Nam) và được xử lý bằng phần mềm BioEdit (ver.7.0.9.0, USA). Sử dụng công cụ BLAST để so sánh đoạn gen của các mẫu nấm ở vùng ITS với dữ liệu có sẵn trên NCBI. Kết quả giải trình tự vùng ITS của bốn mẫu nấm cho thấy mẫu LA02-2 (nhóm 1) tương đồng với vùng ITS của loài *Penicillium menorum* với độ tương đồng là 99,66%; mẫu BT01-1 (nhóm 2), BT08-2 (nhóm 3) và BT08-1 (nhóm 4) lần lượt tương đồng với *Purpureocillium lilacinum*, *Aspergillus allahabadii*, *Cladosporium tenuissimum* với độ tương đồng tương ứng là 100%; 100%; 99,15%.



Hình 2. Sản phẩm PCR điện di 4 mẫu tại vùng ITS với cặp mồi ITS1F - ITS4 trên gel agarose 1%, 100 V trong 30 phút

(M: ladder, 1: LA02-2 (nhóm 1), 2: BT01-1 (nhóm 2), 3: BT08-2 (nhóm 3), 4: BT08-1 (nhóm 4), (-): đối chứng)

Tất cả 33 mẫu nấm thuộc các loài *P. menorum*, *P. lilacinum*, *A. allahabadii*, và *C. tenuissimum* hiện diện không đồng nhất ở Bà Rịa - Vũng Tàu (8 mẫu), Bình Thuận (5 mẫu), Đắk Nông (4 mẫu), Lâm Đồng (1 mẫu) và Long An (15 mẫu). Điều này phụ thuộc vào số lượng mẫu thu thập tại từng vùng không đồng đều và khả năng phân lập các dòng nấm từ các mẫu đất thu thập được. Bảng 3 cho thấy các mẫu nấm thuộc loài *P. lilacinum*, *A. allahabadii* xuất hiện trên đất trồng hồ tiêu, chuối và cà phê ở cả bốn vùng Bà

Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Đắk Nông và Long An. Trong đó trên đất trồng chuối tại tỉnh Long An đều có sự hiện diện của 4 loài trên. Tại tỉnh Lâm Đồng chỉ có sự hiện diện của 1 mẫu nấm thuộc loài *C. tenuissimum* được thu thập từ mẫu đất tại vườn cà phê.

4. THẢO LUẬN

Đa số các loài nấm phân lập được đều có giá trị như: *P. menorum* là một loại nấm có tiềm năng tăng cường độ phì nhiêu của đất và thúc đẩy cây trồng phát triển,

được sử dụng làm chất kích thích tăng trưởng cho cây trồng (Lee và ctv., 2015). *P. lilacinum* có thể kiểm soát hiệu quả sự phát triển của trứng và con cái của một số loài *Meloidogyne* spp. trên đồng ruộng (Aminuzzaman và ctv., 2013) và đặc biệt *P. lilacinum* đã được báo cáo có khả năng đối kháng hoàn toàn với nấm *Fusarium oxysporum* (Remya và ctv., 2009). *A. allahabadii* là loài có tiềm năng trong việc kiểm soát sinh học đối

với tác nhân gây hại là tuyến trùng trong đất nhưng cần phải được nghiên cứu thêm (Affokpon và ctv., 2010). *C. tenuissimum* được xem là một tác nhân kiểm soát sinh học đối với nấm gây bệnh gỉ sắt, làm giảm mạnh số lượng và tuổi thọ của bào tử nấm gây bệnh gỉ sắt, *C. tenuissimum* được sử dụng cùng với các biện pháp quản lý tổng hợp và có thể trở thành một biện pháp kiểm soát lâu dài và ổn định (Moricca, 2004).

Bảng 3. Sự phân bố của các chủng nấm ở các vùng thu thập mẫu khác nhau

Chủng	Tỉnh				
	Bà Rịa - Vũng Tàu	Bình Thuận	Đắk Nông	Lâm Đồng	Long An
<i>P. menonorum</i>	-	-	-	-	6
<i>P. lilacinum</i>	6	1	3	-	3
<i>A. allahabadii</i>	2	3	1	-	4
<i>C. tenuissimum</i>	-	1	-	1	2
Tổng	8	5	4	1	15

Tuy nhiên, nghiên cứu chỉ mới dừng lại ở việc xác định các loài nấm có ích trong đất trồng một số cây công nghiệp, vì vậy cần đánh giá chính xác bởi những nghiên cứu sâu hơn về tác động có lợi của các mẫu nấm đối với cây trồng.

5. KẾT LUẬN

Từ 111 mẫu đất ban đầu được thu thập tại các vườn hồ tiêu, chuối, cà phê và chè đã phân lập được 33 mẫu nấm thuộc các chi *Penicillium*, *Purpureocillium*, *Aspergillus* và *Cladosporium*. Trong đó 6 mẫu nấm thuộc về loài *P. menonorum* chỉ hiện diện ở đất trồng chuối tại tỉnh Long An; 13 mẫu thuộc về loài *P. lilacinum*; 10 mẫu thuộc về loài *A. allahabadii* hiện

diện ở cả bốn vùng Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận, Đắk Nông và Long An trên các vườn cây trồng như hồ tiêu, chuối và cà phê; 4 mẫu còn lại thuộc về loài *C. tenuissimum* hiện diện tại đất trồng hồ tiêu, chè, chuối ở cả 3 tỉnh Bình Thuận, Lâm Đồng, Long An. Tiếp tục nghiên cứu các mẫu nấm đã được định danh nhằm đánh giá chính xác tác động có lợi đối với cây trồng giúp phục vụ cho công tác bảo vệ thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Affokpon A., Coyne D.L., Tossou C., and Coosemans J., 2010. First report of *Aspergillus allahabadii* Mehrotra and Agnihotri in vegetable fields in Northern Benin (West - Africa). *Bull Rec Agron Bénin*, 67.

2. Agrios G.N., 2005. *Plant pathology*, 5th edition. Elsevier Academic Press, New York, USA.
3. Aminuzzaman F.M., Xie H.Y., Duan W.J., Sun B.D., and Liu X.Z., 2013. Isolation of nematophagous fungi from eggs and females of *Meloidogyne* spp. and evaluation of their biological control potential. *Biocontrol science and technology*, 23: 170 - 182.
4. Bensch K., Braun U., Groenewald J.Z., and Crous P.W., 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in mycology*, 72: 1 - 401.
5. Bhai R.S., Remya B., Jithya D., and Eapen S.J., 2009. In vitro and in planta assays for biological control of *Fusarium* root rot disease of vanilla. *Journal of Biological Control*, 83 - 86.
6. Lee Y.S. et al., 2015. *Penicillium menorum*: A Novel Fungus to Promote Growth and Nutrient Management in Cucumber Plants. *Mycobiology*, 43: 49 - 56.
7. Luangsa-ard J.J., et al., 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* 321: 141 - 149.
8. Moricca, Salvatore, Alessandro Ragazzi, and Gemma Assante, 2005. Biological control of rust fungi by *Cladosporium tenuissimum*. *Rust diseases of willow and poplar*. Wallingford UK: CABI Publishing 213 - 229.
9. Raper D. and Fennell D., 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, MD: *William & Wilkin*, USA, pp. 442 - 490.
10. Visagie I C.M., et al., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78: 343 - 371.
11. White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18: 315 - 322.

ABSTRACT

Studies on the useful fungi in soils collecting from industrial plants

Using biofungicides generated from useful microorganisms in order to partially replace the chemical fungicides, that give food and environment protection. Focussing on useful fungi, we collected 111 soil samples from blackpepper, banana, coffee, and tea fields in Ba Ria - Vung Tau, Binh Thuan, Dak Nong, Lam Dong and Long An province. As results, 33 isolates were obtained belonging to genus of Penicillium, Purpureocillium, Aspergillus, and Cladosporium. Further working on morphological observation and ITS1F-ITS4 sequence comparasion, we found six isolates identified as Penicillium menorum, this species was collected in banana soils in Long An provine. Purpureocillium lilacinum found 13 isolates and 10 isolates identified as Aspergillus allahabadii, all of them presented in blackpepper, banana, and coffee fields. Remaining isolates were Cladosporium tenuissimum, collected in bacckpepper, tea, and banana fields in Binh Thuan, Lam Dong, and Long An. Results suggested that some isolates characterised as PGPR could be used in organic agriculture in the future.

Keywords: PGPR, useful fungi, *Penicillium* sp., *Purpureocillium lilacinum*.

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH NẤM *Colletotrichum gloeosporioides* GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY CAM TẠI CAO PHONG, HÒA BÌNH

Phạm Quang Huy¹, Hồ Mạnh Tường¹,
Trần Thị Hoa¹, Nguyễn Thị Hồng Hà¹, Lê Văn Mạnh¹,
Chu Hoàng Hà¹, Đỗ Tiến Phát^{1*}

Viện Công nghệ Sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
* E-mail liên hệ: dtphat@ibt.ac.vn

TÓM TẮT

Nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên nhiều đối tượng cây trồng đặc biệt là cây có múi. Xác định chính xác loài nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh trên cây cam tại Cao Phong, Hòa Bình đóng vai trò quan trọng trong phòng, chống bệnh bởi đây là một trong các bệnh hại nghiêm trọng nhất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập được 08 chủng nấm có đặc điểm hình thái của loài nấm *C. gloeosporioides*. Trong đó, 03 chủng nấm cho kết quả dương tính với mọi đặc hiệu của loài *C. gloeosporioides*. Kết quả giải và so sánh trình tự vùng ITS kết hợp với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI một lần nữa khẳng định 03 chủng nấm phân lập từ mẫu bệnh thán thư của cam Cao Phong có độ tương đồng cao với loài *C. gloeosporioides*. Kết quả nghiên cứu này cho thấy nấm *C. gloeosporioides* là nhóm bệnh hại quan trọng trên cây có múi tại vùng trồng cam Cao Phong, Hòa Bình và là cơ sở cho công tác theo dõi, dự báo và thiết lập sớm biện pháp quản lý, phòng trừ bệnh hại cho địa phương.

Từ khóa: bệnh thán thư, cam Cao Phong, cây có múi, *Colletotrichum gloeosporioides*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam Cao Phong mang lại nguồn lợi kinh tế lớn cho tỉnh Hòa Bình [4]. Hiện tại diện tích trồng cam ở Cao Phong khoảng 1.500 ha, sản lượng ước 18.000 tấn. Trong quá trình canh tác, việc lạm dụng phân hóa học, thuốc bảo vệ thực vật không kiểm soát làm đất chai cứng, làm giảm khả năng hấp thu dinh dưỡng và hệ vi sinh vật có ích giảm sút. Thói quen canh tác xấu tạo điều kiện

thuận lợi cho các bệnh hại phát triển trong đó có các bệnh do nấm gây ra như: bệnh thán thư, bệnh vàng lá gân xanh, bệnh chảy gôm, bệnh lở cổ rễ v.v. [8].

Qua thống kê có thể thấy bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra có tốc độ lây lan rất nhanh và có thể bùng phát thành dịch. Trong đó, loài *C. gloeosporioides* là loài gây bệnh thán thư phổ biến nhất trên các cây ăn trái, cây có múi ở vùng nhiệt đới nóng ẩm. Theo Kim và cộng sự (2006), nấm *C. gloeosporioides* được biết

đến là nguyên nhân chủ yếu gây bệnh thán thư trên nhiều loại cây trồng bởi khả năng gây hại trên các bộ phận từ lá, cành, chồi non, quả non trên nhiều đối tượng cây trồng ngắn ngày và công nghiệp như keo, hồ tiêu, ớt, măng cầu, thanh long, cam quýt v.v.. Tại Việt Nam, những công bố về bệnh thán thư trên cây cam còn nhiều hạn chế. Nguyễn Thị Hoàng Nữ và cộng sự (2018) đã xác định được 6/8 dòng nấm phân lập có khả năng xâm nhiễm gây triệu chứng khô cuống trái cam soàn ở điều kiện ngoài vườn tại Đồng Tháp thuộc loài *Colletotrichum gloeosporioides* [9]. Bên cạnh đó ít nhất bốn loài nấm *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. nigrum* và *C. acutatum* được công bố gây bệnh thán thư trên ớt [5]. Thêm vào đó, hai loài nấm *C. asianum* và *C. acutatum* được phát hiện trên giống xoài Đài Loan [10]. Ngoài ra, loài nấm *C. gloeosporioides* cũng được ghi nhận gây bệnh trên măng cầu ta ở Bình Thuận, Tây Ninh và gây bệnh trên giống thanh long ruột trắng Chợ Gạo, giống ruột trắng Bình Thuận, giống ruột đỏ, giống tím hồng [1, 11]. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy loài *C. gloeosporioides* là tác nhân gây bệnh phổ biến nhất trong số các loài *Colletotrichum* sp. được biết tại Ấn Độ [12]. Theo Yoshida (2002) cho biết nấm *C. acutatum* và *C. gloeosporioides* được xác định là nguyên nhân gây ra bệnh thán thư trên hơn 50 loại cây trồng tại Nhật Bản [19]. Lần đầu tiên sự xuất hiện và khả năng lây nhiễm của các chủng *C. gloeosporioides* liên quan đến chanh Italy tại Mexico được phát hiện [16]. Thêm vào đó, Weixia Wang và cộng sự (2021) cũng đã phát hiện loài nấm *C. gloeosporioides* trên cây có múi ở Australia [18].

Hiện tại, nghiên cứu về tình trạng bệnh thán thư trên cây cam ở Cao Phong, Hòa Bình vẫn còn nhiều hạn chế mặc dù

các biểu hiện, triệu chứng của bệnh đã xuất hiện và gây thiệt hại tới năng suất, chất lượng. Do đó, việc phân lập và định danh loài nấm gây bệnh thán thư trên cam Cao Phong sẽ giúp cho việc phòng trừ bệnh hiệu quả hơn. Gần đây, sự kết hợp các đặc điểm hình thái với các phân tích sinh học phân tử giúp xác định chính xác hơn các loài nấm gây bệnh trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và định danh thành công nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây cam Cao Phong dựa vào đặc điểm hình thái và sinh học phân tử của loài nấm này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Các mẫu quả và lá cam có triệu chứng bị bệnh giống với dấu hiệu nhận biết bệnh thán thư (vết đốm nhỏ, tròn, vàng nhạt cho đến nâu, quả bị nứt, lá có vòng đồng tâm màu đen vết bệnh khô v.v.) được thu thập tại vùng trồng cam Cao Phong, Hòa Bình phục vụ cho phân lập và xác định tác nhân gây bệnh [8].

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập nấm tổng số

Các bước xử lý mẫu và tiến hành phân lập được thực hiện theo mô tả có cải tiến của Trần Đức Thắng (2019). Mẫu bệnh được rửa sạch và khử trùng bằng cồn 70° trước khi các vị trí bệnh được cắt thành các mảnh nhỏ 2 mm² chuyển vào bình nước cất đã khử trùng và lắc 2 giờ với tốc độ 150 vòng/phút. Dịch sau lắc được chuyển sang 100 mL môi trường PDA (200 g khoai tây, 20 g glucose, 20 g agar) có bổ sung kháng sinh (penicillin và ampecilin 10 mg/ml). Chủng nấm có hình thái giống với nấm *Colletotrichum*

gloeosporioides được thu nhận và cấy chuyển 3 lần để thu được chủng sạch (thuần khiết) trước khi bảo quản trong glyceron cũng như tiến hành các thí nghiệm tiếp theo [10].

2.2.2. Phân loại nấm *C. gloeosporioides* theo hình thái

Xác định và mô tả đặc điểm của nấm *C. gloeosporioides* trên môi trường thạch PDA dựa vào hình thái màu sắc của tản nấm và hình thái hệ sợi, hình dạng, kích thước, màu sắc bào tử trên kính hiển vi quang học theo khóa phân loại của Sutton [17].

2.2.3. Xác định chủng nấm *C. gloeosporioides* thông qua phương pháp phân tử

DNA tổng số của chủng nấm phân lập được tách chiết và làm sạch theo quy trình của Lee và Taylor [15]. Cặp mồi ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') và ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') được dùng để nhân đoạn gen mã hóa ITS. Sản phẩm PCR được tinh sạch và sử dụng để giải trình tự theo phương pháp Sanger trên hệ thống ABI PRISM 3100

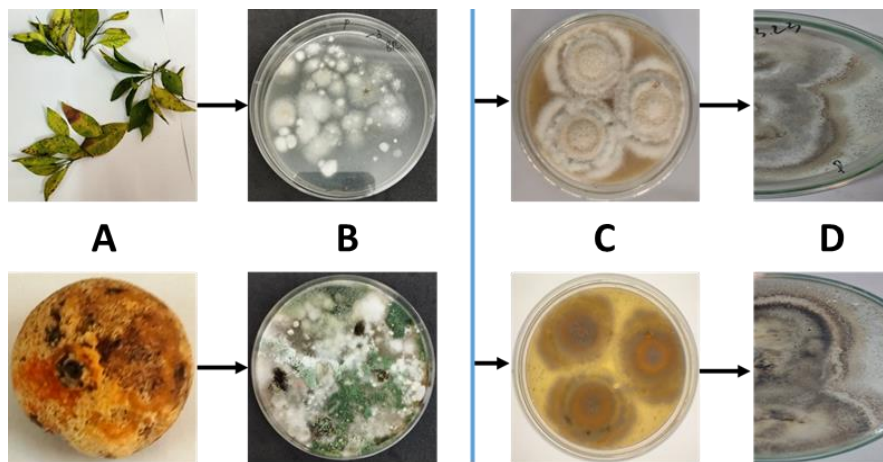
Avant Data Collection v1.0. Ngoài ra, cặp mồi đặc hiệu nấm *C. gloeosporioides*. MKCgF (5'-TTGCTTCGGCGGGTAGGGTC - 3') và MKCgR (5' - ACGCAAAGGAGGCTCCGGGA - 3') được sử dụng để kiểm tra các mẫu nấm nghiên cứu [13].

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: H₂O khử ion, mồi F/R 10 pmol/μL, Master mix 2X, DNA 50 ng/μL. Các chu kỳ nhiệt (34 chu kỳ): 95°C: 30 giây, 57°C: 30 giây, 72°C: 30 giây. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái của nấm *C. gloeosporioides* phân lập từ cam Cao Phong

Trong quá trình phân lập, đa dạng các chủng loại nấm được ghi nhận từ các mẫu bệnh nghiên cứu. Trong số đó, 08 khuẩn lạc có hình dạng và màu sắc giống với đặc điểm đã được mô tả của nấm *C. gloeosporioides* như sợi nấm mảnh, màu trắng, mọc bung mép tròn đều và mọc thành những vòng tròn đồng tâm.



Hình 1. Phân lập nấm từ mẫu lá và cam bị nhiễm bệnh trên đĩa thạch PDA

(A: mẫu lá và quả bị bệnh; B: nấm tổng số từ mẫu bệnh; C: hệ sợi nấm *C. gloeosporioides* trên đĩa thạch PDA (mặt trước và sau); D: bào tử nấm *C. gloeosporioides* trên đĩa thạch PDA (mặt trước và sau 15 ngày nuôi))

Các khuẩn lạc này tiếp tục được tách và làm sạch qua các lần cấy chuyển tiếp theo. Sau 3 ngày nuôi cấy trên đĩa thạch PDA, các chủng nấm được làm sạch được quan sát tản nấm màu trắng, mọc nổi (khuẩn ty khí sinh hướng lên) và phân bố đều trên bề mặt thạch, có vòng tròn đồng tâm. Sau 7 ngày sợi nấm chuyển dần từ màu trắng đến xám hay nâu, mặt dưới đĩa thạch có màu xám đen xen kẽ lẫn nhau theo các đường tròn đồng tâm. Hệ sợi nấm thẳng, ít phân nhánh cũng như chia đốt (hình 1).

Kích thước và hình thái khuẩn ty nấm thu thập giống với mô tả trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Bá (2005) về nấm *C. gloeosporioides* với hệ khuẩn ty thật, sợi nấm mảnh, phân nhánh, không màu và có vách ngăn sợi nấm. Châu Trùng Dương và cộng sự (2022) đã phân lập được nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh trên xoài với tản nấm tạo các vòng tròn đồng tâm, có màu sắc thay đổi theo thời gian và trên đầu hệ sợi có những giọt tiết màu cam. Nấm *C. gloeosporioides* cũng được ghi

nhận gây bệnh trên măng cầu ta ở Bình Thuận và Tây Ninh với các đặc điểm về sợi nấm, tản nấm, bào tử và giác bám được thông kê và mô tả này (1).

3.2. Đặc điểm hình thái hệ sợi, bào tử nấm *C. gloeosporioides* từ cam Cao Phong

Trên đĩa thạch khuẩn lạc nấm sau 15 ngày nuôi cấy xuất hiện các đốm đen hoặc nâu xám theo các vòng nấm. Dưới kính hiển vi với độ phóng đại 100 lần, bào tử nấm không màu, có hình trụ hai đầu tròn, kích thước trung bình khoảng $2 - 6 \times 10 - 17 \mu\text{m}$ (hình 2). Bào tử có khả năng nảy mầm sau 24 h nuôi cấy trên đĩa thạch PDA ở 30°C .

Hình dáng và kích thước của bào tử gần giống với *C. gloeosporioides* mà Đoàn Thị Lan Anh và cộng sự (2019) phát hiện trên măng cầu ta ở Bình Thuận và Tây Ninh tuy nhiên điểm khác biệt là thời gian hình thành bào tử của nấm *C. gloeosporioides* từ cam Cao Phong là lâu hơn. Theo Yoshida (2022), nấm *C. gloeosporioides* có bào tử đơn bào, trong suốt, dạng một đầu nhọn một đầu tròn hay hai đầu tròn, kích thước $9 - 24 \times 3 - 4,5 \mu\text{m}$ [1, 19].



Hệ sợi nấm



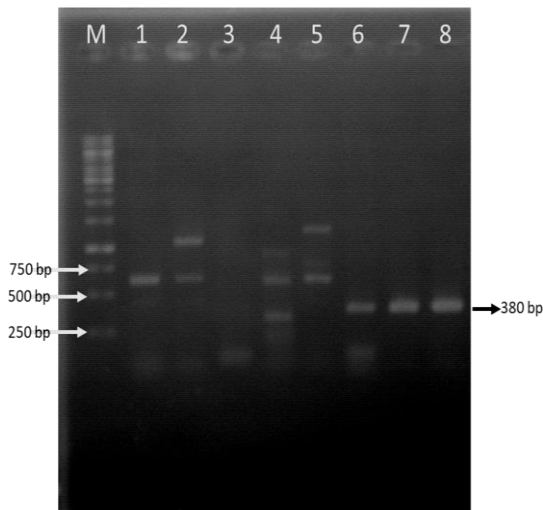
Bào tử nấm

Hình 2. Nấm *C. gloeosporioides* dưới kính hiển (x 100)

Từ kết quả thu được và các tài liệu tiếp cận cho thấy hình dạng sợi nấm và bào tử của 08 chủng nấm phân lập được có sự tương đồng với loài *C. gloeosporioides*. Để có thể khẳng định chính xác kết quả này, các chủng nấm phân lập được tiếp tục định danh dựa trên phân tích trình tự gen vùng ITS và sử dụng cặp mồi đặc hiệu MKCgF/R cho nấm này.

3.3. Xác định nấm *C. gloeosporioides* sử dụng cặp mồi đặc hiệu MKCgF/R

Sau khi tách DNA tổng số của 08 chủng nấm phân lập, nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA này được xác định bằng máy NanoDrop. Nồng độ DNA sẽ được pha loãng đến 50 ng/ μ L được sử dụng trong các phản ứng PCR với cặp mồi MKCgF/R đặc hiệu cho nấm *C. gloeosporioides*. Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở hình 3.



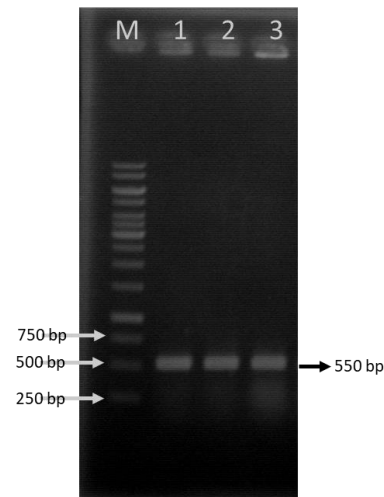
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 8 chủng nấm phân lập sử dụng cặp mồi đặc hiệu MKCgF/R

(M: marker 1 kb (Thermo scientific);
1 - 8: sản phẩm PCR 08 chủng nấm nấm phân lập)

3.4. Định danh nấm *C. gloeosporioides* bằng trình tự đoạn gen ITS

Trong tổng số 08 chủng nấm phân lập được có hình thái ban đầu giống mô tả của nấm *C. gloeosporioides*. Kết quả phân tích PCR với cặp mồi đặc hiệu MKCgF/R xác định được có 03 mẫu nấm cho băng DNA đặc hiệu, rõ nét phù hợp với kích thước lý thuyết 380 bp ở các giếng 6, 7, 8 trên bản điện di (hình 3). Kết quả phân tích sử dụng cặp mồi đặc hiệu bước đầu cho thấy đã xác định được 03 chủng cho sản phẩm PCR đặc hiệu là nấm *C. gloeosporioides* và được đặt tên lần lượt là Coll-1, Coll-2, Coll-3.

Từ kết quả phân tích với cặp mồi đặc hiệu, 03 chủng nấm *C. gloeosporioides* sẽ được xác định trình tự gen vùng ITS với cặp mồi ITS1/4. Kết quả phân tích sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/4 được thể hiện ở hình 4.

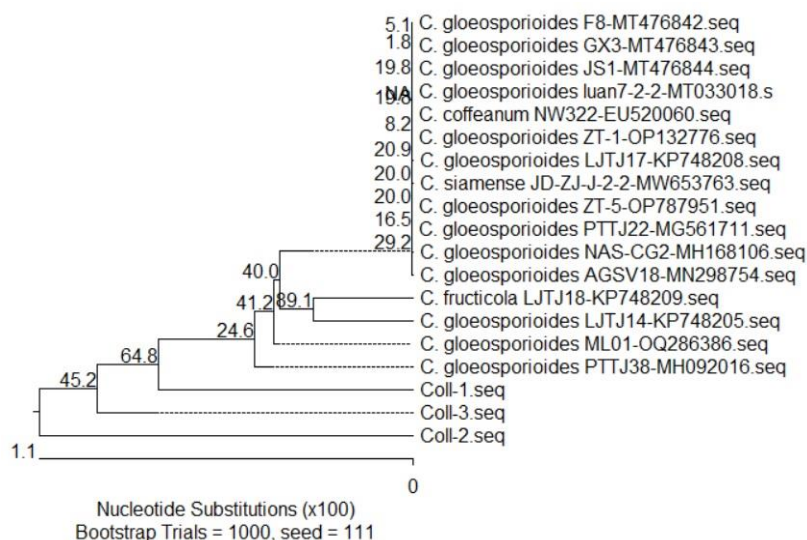


Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 3 chủng nấm *C. gloeosporioides* sử dụng cặp mồi ITS1/4

(M: marker 1 kb (Thermo scientific); 1 - 3: sản phẩm PCR lần lượt của nấm Coll-1, Coll-2 và Coll-3)

Vùng gen ITS thu được có kích thước khoảng 550 bp phù hợp theo tính toán lý thuyết với cặp môi đặc hiệu sử dụng (hình 4). Các sản phẩm PCR của 3 chủng nấm Coll-1, Coll-2 và Coll-3 được tinh sạch và sử dụng để giải trình tự theo

phương pháp Sanger. Cây phân phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng gen ITS của 3 chủng nấm nghiên cứu và các chủng tham chiếu trên ngân hàng gen NCBI được thiết lập (hình 5).



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của 3 chủng nấm Coll-1, Coll-2, Coll-3 phân lập với 12 chủng *C. gloeosporioides* khác nhau, 1 loài *C. fructicola*, 1 loài *C. siamense* và 1 loài *C. coffeanum* trên ngân hàng gen Bank NCBI

Dựa vào cây phát sinh chủng loại cho thấy ba chủng nấm phân lập được có độ tương đồng cao trên 98% với các đại diện thuộc loài *C. gloeosporioides*. Tuy nhiên, trình tự vùng ITS của chủng Coll-2 có sự sai khác so với hai chủng Coll-1 và Coll-3 (hình 5). Mặc dù vậy, cả 3 chủng này đều có trình tự tương đồng cao với các chủng khác trong loài *C. gloeosporioides*. Do vậy, cần có các nghiên cứu sâu hơn về sự khác biệt của 3 chủng nấm đã phân lập được.

4. KẾT LUẬN

Kết quả phân lập, định danh dựa vào đặc điểm hình thái (hệ sợi và bào tử) và kỹ thuật phân tử (sử dụng cặp môi đặc hiệu MKCgF/MKCgR và ITS1/ITS4) đã xác

định được ba chủng nấm gây bệnh thân thư trên cam Cao Phong, Hòa Bình thuộc loài *Colletotrichum gloeosporioides* và được đặt tên là Coll-1, Coll-2, Coll-3. Kết quả này giúp nhà vườn định hướng để phòng và trừ bệnh nhằm nâng cao năng suất, chất lượng của cam và giảm thiệt hại do nấm bệnh gây ra.

Lời cảm ơn: công trình này được thực hiện bằng nguồn kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu hệ vi sinh vật vùng rễ trên cây công nghiệp (cà phê) và cây ăn quả (cây cam) tại Việt Nam nhằm nâng cao sinh trưởng và tính chống chịu mầm bệnh” do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cấp giai đoạn từ 2023 - 2025 với mã số: TĐCPVS.02/23 - 25.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đoàn Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Hải Hằng và Lê Đình Đôn, 2019. Đặc điểm hình thái, sinh học và phân tử của nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây măng cầu ta (*Annona squamosa* L.) tại tỉnh Bình Thuận và Tây Ninh. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*. Số 2/2019, trang 25 - 33.
- Châu Trùng Dương, Nguyễn Thị Như Ý, Nguyễn Thị Thu Nga, Đoàn Thị Kiều Tiên, Nguyễn Thị Ngọc Trúc và Lưu Thái Danh, 2022. Các loài nấm (*Colletotrichum* spp.) gây bệnh thán thư có độc tính cao trên xoài cát Chu ở đồng bằng Sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, kỳ 2 - tháng 9/2022, trang 50 - 57.
- Bùi Kim Đồng, Nguyễn Thị Hiền, Hoàng Thị Thu Huyền và Hoàng Hữu Nội, 2020. Nghiên cứu xây dựng và phát triển thương hiệu “Cam Cao Phong” cho sản phẩm cam của huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp Việt Nam*. Số 8(117)/2020.
- Ngô Bích Hào, 1992. Bệnh thán thư hại ớt. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 124(4): 15 - 17.
- Phạm Văn Kim, 2006. Các nguyên lý về bệnh hại cây trồng. Nxb. Đại học Cần Thơ.
- Lê Thanh Khang, Nguyễn Thị Thu Hương và Lê Thị Thủy Tiên, 2020. Hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum capsici* gây bệnh thán thư trên ớt sau thu hoạch của tinh dầu trầm trà (*Meleleuca alternifolia*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56. Số 2, trang 57 - 66.
- Nguyễn Văn Nga và Cao Văn Chí, 2013. Sổ tay hướng dẫn phòng trừ sâu, bệnh hại trên cây ăn quả có múi. Trung tâm Khuyến nông Quốc gia - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, trang 50 - 51.
- Nguyễn Thị Hoàng Nữ, Mai Nguyễn Minh Trí, Huỳnh Kỳ, Nguyễn Thị Thu Nga, Đoàn Thị Kiều Tiên và Văn Quốc Giang, 2018. Xác định tác nhân gây bệnh thối khô cuống trái cam soàn (*Citrus sinensis* L.) tại Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54. Số 4, trang 100 - 107.
- Trần Đức Thắng, Đào Uyên Trân Đa, Nguyễn Ngọc Linh và Lê Đình Đôn, 2019. Nghiên cứu nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây xoài. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*. Số 6/2019, trang 24 - 31.
- Đặng Thị Kim Uyên, Trần Vũ Phấn và Nguyễn Văn Hòa, 2021. Nghiên cứu lưu tồn nấm *Colletotrichum* spp. trong vườn trồng thanh long. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, năm thứ 16, số 09, trang 84 - 91.
- Gautam, A. K., 2014. The genera *Colletotrichum*: an incitant of numerous new plant diseases in India. *Journal on New Biological Reports*, 3(1), 9 - 21.
- Kamle, M., Pandey, B. K., Kumar, P., & Kumar, M., 2013. A species - specific PCR based assay for rapid detection of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4(6).
- Lakshmi, S. U., Sri Deepthi, R., Pedda, K. D., Neetha, P., & Krishna, M. S. R., 2014. Anthracnose, a prevalent disease in Capsicum. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3), 1583 - 1604.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W., 1990. Isolation of DNA from Fungal Mycelia and Single Spores. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, 282 - 287.
- Patricia, L. C. C., Del Socorro, R. G. M., Iván, R. H., Erika, D. L. C. A., Keiko, S., & Alberto, N. Z. J., 2021. Occurrence and infective potential of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates associated to Citrus limon var Eureka. *Biotechnology Reports*, 31, e00651.

16. Sutton, Brian C, 1980. The Coelomycetes fungi Imperfecti with pycnidia, Acervuli and Stromata, Commonwealth, Mycological Institute pages 523 - 537.
17. Wang, W., de Silva, D. D., Moslemi, A., Edwards, J., Ades, P. K., Crous, P. W., & Taylor, P. W. J., 2021. *Colletotrichum* species causing anthracnose of citrus in Australia. *Journal of Fungi*, 7, 47.
18. Yoshida, S., Asakawa, S., Toe, A., 2002. Mitotic exit network controls the localization of Cdc 14 to the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Biology*, 12(11), 944 - 50.

ABSTRACT

Isolation and characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on sweet orange (*Citrus sinensis*) at Cao Phong, Hoa Binh

Colletotrichum gloeosporioides is one of the most serious pathogens that causes anthracnose diseases in different plant species, especially citrus. The isolation and characterization of this fungal species from Cao Phong orange will be important for disease prevention and management. In this study, we collected and cloned eight fungal isolates that showed morphological characteristics of *C. gloeosporioides*. In which, three isolates were positive for specific primers of *C. gloeosporioides*. Moreover, the sequence analysis of the ITS fragment confirmed that the three fungal isolates belong to *C. gloeosporioides*. Our current study provides important information for the prediction and establishment of sufficient methods to manage and control this disease at its early stages.

Keywords: Anthracnose, Cao Phong orange, ITS, *Colletotrichum gloeosporioides*.

NGHIÊN CỨU TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA KỸ THUẬT ĐỐN TỈA CÀNH ĐẾN BỆNH PHẤN TRẮNG TRÊN CÂY TÁO TẠI NAM TRUNG BỘ

**Mai Văn Hào¹, Nguyễn Văn Chính^{1*},
Nguyễn Thị Bích Ngọc², Phan Công Kiên¹,
Nguyễn Văn Liêm², Phạm Dũng³, Phạm Mỹ Liên⁴**

¹*Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển nông nghiệp Nha Hồ*

²*Viện Bảo vệ thực vật*

³*Chi cục Trồng trọt và BVTN Ninh Thuận*

⁴*Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam*

* E-mail liên hệ: chinh.nha.ho@gmail.com

TÓM TẮT

*Bệnh phấn trắng gây hại phổ biến trên cây táo tại Nam Trung Bộ. Nghiên cứu ứng dụng sinh học phân tử để xác định tác nhân và ảnh hưởng của kỹ thuật đốn tỉa cành đến mức độ gây hại của bệnh từ năm 2020. Kết quả cho thấy, bệnh thường gây hại trên các bộ phận như quả non, hoa và lá. Trong tự nhiên, bệnh gây thiệt hại nhiều nhất trên quả non. Khi môi trường thuận lợi, nấm phát triển thành lớp có màu trắng bao phủ trên vết bệnh. Đã xác định được tác nhân gây bệnh phấn trắng trên cây táo là do nấm *Oidium heveae* gây ra, giai đoạn hữu tính là *Erysiphe quercicola*. Kỹ thuật đốn tỉa cành có ảnh hưởng đến sự phát triển và gây hại của bệnh. Khi mật độ cành trên cây táo càng cao thì bệnh phấn trắng gây hại càng nặng. Trong đó, bệnh phấn trắng gây hại quả táo ít nhất ở công thức cắt để 5 cành cấp 2/cây, đây cũng là công thức có năng suất táo cao nhất.*

***Từ khóa:** cây táo, bệnh phấn trắng, *Oidium heveae*, *Erysiphe quercicola*.*

1. MỞ ĐẦU

Cây táo đang dần trở thành một trong những cây ăn quả quan trọng của khu vực Nam Trung Bộ với diện tích trên 1.300 ha và giá trị sản xuất cao hơn nhiều các loại cây trồng phổ biến khác. Trong điều kiện sản xuất thâm canh tốt, cây táo có thể cho thu nhập trên dưới 1 tỷ đồng/ha/năm. Cây táo có khả năng chịu hạn và sinh trưởng phát triển tốt tại các tỉnh trong vùng. Tại đây, cây táo có thể ra hoa, đậu quả quanh

năm. Tuy vậy, cây táo sinh trưởng phát triển tốt nhất trong vụ khô. Hiện nay, cây táo đang được các tỉnh Ninh Thuận, Bình Thuận và Khánh Hoà quan tâm ưu tiên phát triển.

Trong thực tế, cây táo là một trong những loại cây ăn quả bị nhiều loài sinh vật gây hại. Trong đó, bệnh phấn trắng là bệnh hại nguy hiểm nhất. Tuy nhiên, việc nghiên cứu tác nhân gây bệnh và kỹ thuật quản lý bệnh hại trên cây táo chưa được nghiên cứu nhiều. Để quản lý bệnh phấn trắng hại táo có hiệu quả cao thì trước hết

Người phân biên: PGS.TS. Trần Thị Thu Hà

cần phải xác định được tác nhân gây bệnh. Đồng thời, cũng cần đánh giá ảnh hưởng của việc áp dụng các biện pháp kỹ thuật đến phát sinh, phát triển của bệnh phấn trắng. Sự phát sinh, gây hại của vi sinh vật trên cây trồng không những phụ thuộc vào ký chủ, tác nhân gây bệnh mà còn phụ thuộc vào điều kiện tiêu khí hậu môi trường ở cánh đồng táo. Kỹ thuật đốn cành, tạo tán không những có ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng phát triển của cây táo mà còn ảnh hưởng đến điều kiện tiêu khí hậu của cánh đồng táo, mà chủ yếu là ánh sáng, nhiệt độ và ẩm độ. Điều này có tác động không nhỏ đến sự phát sinh, phát triển và gây hại của bệnh phấn trắng trên cây táo. Xuất phát từ thực tiễn đó, chúng tôi “*Nghiên cứu tác nhân gây bệnh và ảnh hưởng của kỹ thuật đốn tỉa cành đến bệnh phấn trắng trên cây táo tại Nam Trung Bộ*”.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- **Thời gian:** từ tháng 01/2020 đến tháng 12/2022.

- **Địa điểm nghiên cứu:** các vùng trồng táo tại Nam Trung Bộ (Ninh Thuận, Bình Thuận, Khánh Hoà), Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển nông nghiệp Nha Hồ (Ninh Thuận), Viện Bảo vệ thực vật (Hà Nội).

2.2. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu

Các dụng cụ điều tra, thu mẫu, túi thu mẫu, kính hiển vi, máy ảnh. Các vật tư, dụng cụ phòng thí nghiệm: ống eppendorf,

dung dịch CTAB, isoamyl alcohol, Ethanol 70%, dung dịch đệm TE, nước siêu sạch (Invitrogen), máy ly tâm, máy PCR Mastercycler X50S, cặp mồi ITS4/ITS5; NL1/NL4, gel agarose, đệm TAE (Tris Acetic acid EDTA), thuốc nhuộm RedSafe (20000X).

2.2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

a) Nghiên cứu tác nhân gây bệnh phấn trắng trên cây táo tại Nam Trung Bộ

* Phương pháp thu thập mẫu: i) thu mẫu trên các ruộng táo bị nhiễm bệnh phấn trắng tại Ninh Thuận (Ninh Sơn, Ninh Phước), Khánh Hoà (Cam Ranh) và Bình Thuận (Tuy Phong) theo phương pháp điều tra định kỳ và có điều tra bổ sung. Mỗi vùng điều tra 3 ruộng, mỗi ruộng điều tra 5 điểm theo 2 đường chéo góc (3 cây/điểm); ii) số lượng mẫu thu thập: 10 mẫu bệnh hại/điểm điều tra \times 5 điểm/1 tỉnh \times 3 tỉnh; iii) thu thập tất cả các triệu chứng bệnh phấn trắng trên tất cả các bộ phận bị hại của cây táo. Các mẫu được bảo quản trong túi giấy. Sau khi thu thập, mẫu được gửi ngay về phòng thí nghiệm để theo dõi. Ghi rõ các thông tin của mẫu bao gồm ngày, địa điểm, tên chủ ruộng, giống, tuổi cây, bộ phận bị hại, điều kiện đất đai, biện pháp quản lý bệnh đang áp dụng.

* Phương pháp giám định tác nhân gây bệnh phấn trắng hại táo: theo đồng thời hai phương pháp:

(i) Phương pháp truyền thống, để ẩm mẫu rồi soi dưới kính hiển vi quang học quan sát sự phát triển của sợi nấm và bào tử, đặc điểm của sợi nấm, bào tử.

Xác định tác nhân gây bệnh theo nguyên tắc Koch's postulates (1984).

Tiến hành phun dung dịch bào tử nấm gây bệnh phấn trắng trên cây táo thu được từ Bình Thuận, Ninh Thuận và Khánh Hoà (nấm 5×10^6 bào tử/ml) ướt đều trên toàn cây táo đang có quả non được chuẩn bị sẵn trong nhà kính, mỗi nguồn nấm phun lên 10 cây. Tiến hành lây nhiễm trong điều kiện mùa mưa, ngay sau khi phun lây nhiễm, cây táo được duy trì trong điều kiện độ ẩm cao từ 80 - 90% trong 72 giờ, sau đó tiếp tục duy trì ẩm độ cao bằng máy phun sương cho hết kỳ theo dõi.

+ Phương pháp theo dõi: sau khi lây nhiễm tiến hành theo dõi hàng ngày cho đến khi 100% cây lây nhiễm bị bệnh. So sánh triệu chứng bệnh xuất hiện trong các công thức lây nhiễm với triệu chứng bệnh thu thập ngoài đồng ruộng. Tái kiểm tra tác nhân gây bệnh dưới kính hiển vi quang học để so sánh với nguồn lây nhiễm ban đầu.

(ii) Phương pháp ứng dụng công nghệ sinh học.

+ Tách chiết DNA mẫu bệnh bằng dung dịch CTAB: DNA được tách chiết, tinh sạch theo quy trình của Doyle và Doyle (1990): lấy lớp phấn trắng ở mô bị bệnh trên quả táo cho vào ống eppendorf 1,5 ml có chứa 0,3 ml dung dịch CTAB; → Dùng chày nhựa nghiền mẫu tạo thành hỗn hợp đồng nhất và ủ ở 65°C trong 30 phút. Ly tâm 12.000 v/p trong 15 phút. Hút phần dịch bên trên ra ống eppendorf 1,5 ml mới; → Bổ sung chloroform:isoamyl alcohol (24:1) vào ống mẫu và lắc đều dung dịch ống mẫu; → Ly tâm ống mẫu ở 15.000 rpm trong 10 phút; → Dùng pipet hút phần dịch nổi sang ống eppendorf 1,5 ml mới, bỏ phần còn lại; → Thêm lượng tương đương iso-propanol vào ống

eppendorf, lắc đều dung dịch ống mẫu; → Ủ ống mẫu ở -20°C ít nhất trong 1 giờ (hoặc để qua đêm); → Ly tâm ống mẫu ở 15.000 rpm trong 20 phút; → Loại bỏ phần dung dịch bên trên và giữ lại phần kết tủa; → Rửa phần kết tủa bằng cách thêm 500 µl cồn Ethanol 70%, lắc nhẹ ống. Ly tâm ống ở 12.000 rpm trong 10 phút. Quá trình này được lặp lại 2 lần; → Mở nắp ống mẫu để loại bỏ Ethanol còn lại bằng cách để ống mẫu ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (hoặc ủ trong heat block ở 37°C); → Hòa tan kết tủa trong 30 µl dung dịch đệm TE (hoặc nước cất vô trùng); → Bảo quản ống mẫu ở -20°C.

+ Phản ứng PCR: thực hiện với các cặp mồi trình bày tại bảng (bên dưới). Mỗi phản ứng có tổng thể tích 50 µl chứa 18,45 µl nước siêu sạch (Invitrogen), 25 µl GoTaq Green Master Mix (Promega), 2 µl DNA (chiết bằng CTAB) và 1 µl mỗi loại mồi (ITS4/ITS5; NL1/NL4; Btla/Btlb).

Thực hiện phản ứng PCR trên máy PCR Mastercycler X50S với điều kiện sau: khởi đầu biến tính ở 94°C trong 2 phút; tiếp theo là 32 chu trình phản ứng gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 52°C (với cặp mồi ITS4/ITS5; NL1/NL4) và 54°C với cặp mồi Btla/Btlb trong 30 giây, tổng hợp sợi ở 72°C trong 1 phút. Phản ứng được kết thúc với 5 phút ở 72°C.

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% được chuẩn bị bằng đệm TAE (Tris Acetic acid EDTA) và chứa thuốc nhuộm RedSafe (20000X). Gel được chạy trên thiết bị điện di Mupid-exU Mini System (Helixxtec) với đệm TAE ở điện thế 100V trong 30 phút. Kiểm tra bản gel dưới hệ thống chụp ảnh E-Gel®, phân tích và so sánh các vạch băng trên bản gel.

Các môi đã được sử dụng trong định danh phân tử nấm gây bệnh trên táo

Vùng gen	Môi	Trình tự (5' - 3')	Tham khảo
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
28S rDNA	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGA	Glass and Donaldson (1995)
	NL4	TTGGTCCGTGTTTCAAGACG	
β -tubulin	Btla	TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG	Glass and Donaldson (1995)
	Btlb	GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC	

+ Phương pháp tinh chiết DNA, giải trình tự và phân tích trình tự.

Vạch băng chứa sản phẩm DNA trên gel agarose được cắt và bảo quản trong các ống eppendorf mới. Sử dụng kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) để tinh sạch DNA từ gel agarose. Thực hiện tất cả các bước tinh sạch ở nhiệt độ phòng.

Giải trình tự sản phẩm PCR tinh sạch trực tiếp cả 2 chiều với môi tương ứng trong phản ứng PCR. Trình tự DNA hoàn chỉnh của mẫu gửi sau khi được xử lý bằng phần mềm Bioedit được so sánh với các trình tự vùng gen tương ứng đã biết trên cơ sở dữ liệu Genbank bằng phần mềm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Cây phủ hệ được xây dựng theo phương pháp Neighbor - Joining với khoảng cách di truyền giữa các trình tự được xác định dựa trên mô hình thay thế Kimura hai tham số. Giá trị ở các nút là giá trị thống kê Bootstrap dưới dạng % (1000 lần lặp).

+ Chỉ tiêu theo dõi: tác nhân gây bệnh phấn trắng hại trên cây táo.

b) Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật đốn tỉa cành đến bệnh phấn trắng hại táo tại vùng Nam Trung Bộ

Thí nghiệm gồm 5 công thức (cắt để lại 5, 7, 8, 9 và 11 cành cấp 2/cây), bố trí ô

lớn không lặp lại, mỗi ô có diện tích 500 m². Mật độ trồng hàng cách hàng 5 m, cây cách cây 4 m. Theo dõi thí nghiệm trên vườn táo 4 năm tuổi. Các biện pháp kỹ thuật canh tác khác áp dụng theo Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Thuận (2014).

Phương pháp theo dõi thí nghiệm: điều tra 100 quả/cây (rải đều trên ô) từ giai đoạn đậu quả đến cuối vụ. Điều tra 10 ngày/lần. Trên mỗi vườn điều tra 10 điểm ngẫu nhiên, mỗi điểm điều tra 10 quả rải đều trong ô, đánh giá chỉ số bệnh và tỉ lệ bệnh (%) theo thang 9 cấp: i) n1: số quả bị bệnh ở cấp 1 với < 5% diện tích quả bị bệnh; ii) n3: số quả bị bệnh ở cấp 3 với > 5 - 10% diện tích quả bị bệnh; iii) n5: số quả bị bệnh ở cấp 5 với > 10 - 15% diện tích quả bị bệnh; iv) n7: số quả bị bệnh ở cấp 7 với > 15 - 20% diện tích quả bị bệnh; v) n9: số quả bị bệnh ở cấp 9 với > 20% diện tích quả bị bệnh.

- Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất: i) số quả/m²: mỗi ô theo dõi 5 điểm cố định, mỗi điểm 0,25 m² (0,5 × 0,5 m), đếm toàn bộ số quả trong khung trong cả vụ; ii) khối lượng quả: đo khối lượng quả tại 5 điểm, mỗi điểm 10 quả; iii) năng suất thực thu NSTT (tấn/ha) = (năng suất ô thí nghiệm (kg) × 10.000/điện tích ô thí nghiệm (m²) × 10⁻³).

- Xử lý số liệu trên máy vi tính bằng các phần mềm MSTATC và MS Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh phấn trắng trên cây táo tại Nam Trung Bộ

3.1.1. Triệu chứng bệnh phấn trắng hại táo tại Nam Trung Bộ

Bệnh phấn trắng gây hại chủ yếu trên các bộ phận non mềm như quả non, hoa và lá. Trong tự nhiên, bệnh gây hại chủ yếu trên quả non và ít gây hại trên quả chín, lá và hoa. Khi gặp điều kiện môi trường thuận lợi cho nấm bệnh phát triển, trên các vết bệnh xuất hiện lớp nấm màu trắng bao phủ. Triệu chứng nấm bệnh điển hình như sau:

Trên lá: bệnh xuất hiện và gây hại chủ yếu ở mặt dưới của lá. Nhìn bằng mắt thường, ban đầu là dạng chấm nhỏ màu trắng mịn hoặc trắng xám, sau phát triển thành lớp nấm mỏng lan rộng toàn bộ mặt dưới lá. Bệnh hại nặng làm lá bị bệnh thô, cứng, giòn và dễ rụng.

Trên hoa và quả non: hoa bị bệnh khô lại, giòn, biến dạng và không đậu quả. Triệu chứng bệnh trên quả non, ban đầu là lớp nấm nhỏ màu trắng, sau đó lan rộng trên bề mặt quả. Trên quả nhỏ, nấm có thể bao phủ toàn bộ bề mặt quả làm cho quả không phát triển được. Khi bệnh hại nặng, lớp nấm trắng chuyển dần sang màu nâu. Quả sần sùi, có các vết màu thâm đen. Bệnh có thể gây hại cả phần cuống lá (hình 1).

Quan sát mẫu bệnh tươi cho thấy sợi nấm mọc rải rác trên bề mặt mô bị bệnh, đa bào, phân nhánh, không màu. Bào tử mọc thành chuỗi trên cành bào tử, đơn bào, không màu, hình trụ hoặc hình trứng, kích thước bào tử nấm khoảng $30,4 \times 18,3 \mu\text{m}$. Bào tử đầu tiên với phần đỉnh hơi tròn được hình thành từ cành bào tử, các bào tử thứ 2 có hình hơi trụ với đỉnh không tròn. Từ đặc điểm như trên cho thấy nấm bệnh gây hại trên cây táo Nam Trung Bộ là do nấm *Oidium* sp. gây ra.



Hình 1. Triệu chứng và bào tử nấm gây bệnh phấn trắng trên táo

(1, 2: trên quả; 3: bào tử nấm gây bệnh ở độ phóng đại 200 lần)

3.1.2. Kết quả xác định tác nhân gây bệnh phấn trắng trên quả táo tại Nam Trung Bộ

a) Phương pháp truyền thống

Kết quả nghiên cứu cho thấy đến ngày thứ 11 sau khi lây nhiễm 100% số cây táo có triệu chứng đặc trưng của bệnh

phấn trắng trên quả. Triệu chứng bệnh xuất hiện trên quả táo, bào tử và sợi nấm thu được trên cây táo lây nhiễm nhân tạo giống như nguồn nấm bệnh phấn trắng thu được từ quả táo thu từ khu vực Nam Trung Bộ. Từ đó, cho thấy bệnh phấn trắng hại táo tại Nam Trung Bộ do nấm *Oidium* sp. gây ra.



Hình 2. Triệu chứng bệnh thu được khi lấy bệnh nhân tạo

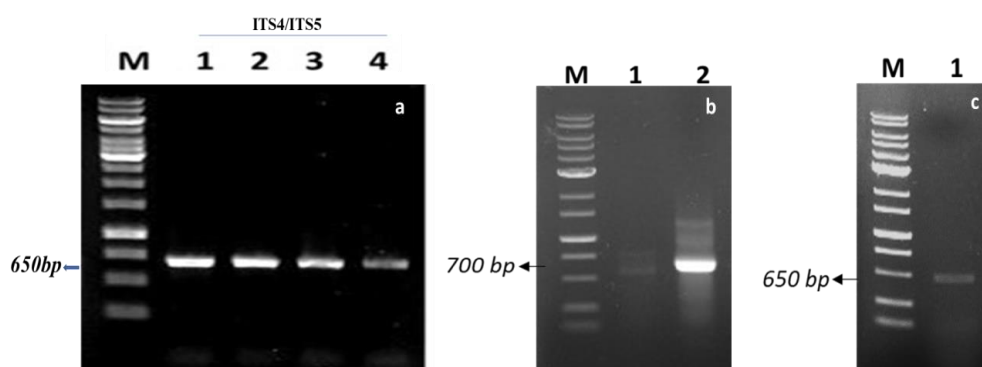


Hình 3. Bào tử và cành bào tử nấm thu được trên vết bệnh

b) Phương pháp ứng dụng công nghệ sinh học

Khi sử dụng các phương pháp phân loại truyền thống đã xác định tác nhân gây bệnh phấn trắng trên cây táo tại các vùng điều tra là nấm *Oidium* sp. Lấy ngẫu nhiên mẫu từ nhóm mẫu đã dùng để phân loại bằng phương pháp truyền thống để phân loại bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Cụ thể, DNA tổng số của 4 mẫu nấm gây

bệnh phấn trắng trên cây táo được tách chiết để định danh nấm bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen vùng ITS, 28S rDNA và β -tubulin. Sử dụng 3 cặp mồi là ITS4/ITS5, NL1/NL4, Btla/Btlb. Sản phẩm PCR của đại diện các mẫu nấm điện di trên gel agarose 1% có kích thước xấp xỉ 650 bp với cặp mồi ITS5/ITS4 (hình 4a), 650 bp với cặp mồi Btla/Btlb (hình 4c), 700 bp với cặp mồi NL1/NL4 (hình 4b).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR các mẫu nấm phân lập trên mẫu bệnh phấn trắng trên táo tại Ninh Sơn - Ninh Thuận

(a: khuếch đại vùng gen ITS bằng cặp mồi ITS5/ITS4, giếng 1 - 4: mẫu nấm phấn trắng trên táo tại Ninh Sơn - Ninh Thuận; b: khuếch đại vùng gen β -tubulin bằng cặp gen Btla/Btlb; c: khuếch đại vùng gen 28S rDNA bằng cặp mồi NL1/NL4; M: 1kb DNA marker) (GenRular - Thermo - hình a; HighRangger - Norgen - hình b, c)

Vùng ITS (Internal transcribed spacer), vùng 28S rDNA và vùng β -tubulin là các vùng gen cơ bản thường

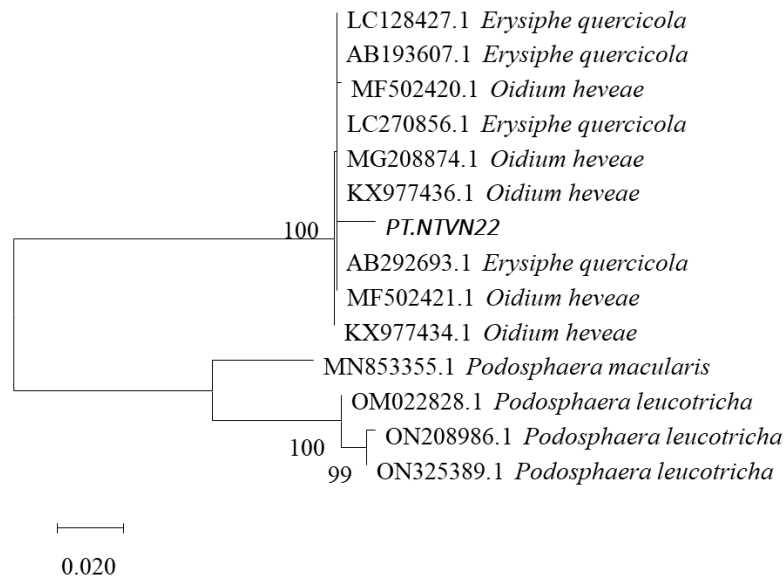
được sử dụng trong phân loại tên chi hoặc có thể đến tên loài của một số loài nấm. Kết quả giải trình tự các mẫu phân tích

vùng 28S rDNA và β -tubulin có kết quả nhiều hai đầu và không xác định được khi so sánh trình tự trên BLAST. Các mẫu phân tích vùng ITS có kết quả tốt và có giá trị để xác định tên nấm gây bệnh phấn trắng trên táo ở Ninh Thuận.

Trình tự gen mẫu nấm số 1 được chọn làm đại diện so sánh mức độ tương đồng trên Ngân hàng gen (ký hiệu mẫu là PT.NTVN22). Cây phả hệ được xây dựng dựa trên 13 trình tự của các loài nấm gây bệnh phấn trắng *Erysiphe quercicola*, *Podosphaera macularis*, *Podosphaera leucotricha* (ở giai đoạn hữu tính) và *Oidium heveae* (ở giai đoạn vô tính) từ Ngân hàng gen. Mẫu nấm PT.NTVN22 gây bệnh phấn trắng trên táo ở vùng Ninh Thuận có trình tự DNA của vùng ITS có độ tương đồng và nằm cùng nhánh với nấm *Oidium heveae* (ở giai đoạn vô tính), *Erysiphe quercicola* (ở giai đoạn hữu tính)

gây bệnh phấn trắng trên cây chôm chôm tại Indonesia, cây cao su tại Braxin và Trung Quốc có mã số Ngân hàng gen là LC128427.1, AB193607.1, MF502420.1, LC270856.1, MG208874.1, KX977436. Nấm tạo thành một nhánh riêng biệt so với các loài *Podosphaera macularis*, *Podosphaera leucotricha* trên cây phả hệ.

Tại Việt Nam, nấm *Oidium* sp. đã được xác định là nguyên nhân gây bệnh phấn trắng trên cây táo ta (*Zyzyphus jujuba* Lamk) tại Tiền Giang, Đồng Nai, Hà Nội, Hưng Yên (Viện Bảo vệ thực vật, 1999a, 1999b). Nấm *Podosphaera leucotricha* được xác nhận là nguyên nhân gây bệnh phấn trắng trên táo tây (*Malus domestica*) tại vùng Hà Giang, Lào Cai (Đặng Vũ Thị Thanh, 2008; Viện Bảo vệ thực vật, 1999b). Bệnh gây hại trên các bộ phận như chồi non, lá non và quả.



Hình 5. Cây phả hệ xây dựng theo phương pháp Neighbor - Joining (Viện Bảo vệ thực vật, 2022)

Dựa vào hình thái của bào tử nấm và sản phẩm PCR của các vùng gen ITS, 28S

rDNA và β -tubulin, phân tích trình tự DNA vùng gen ITS của nấm đã khẳng

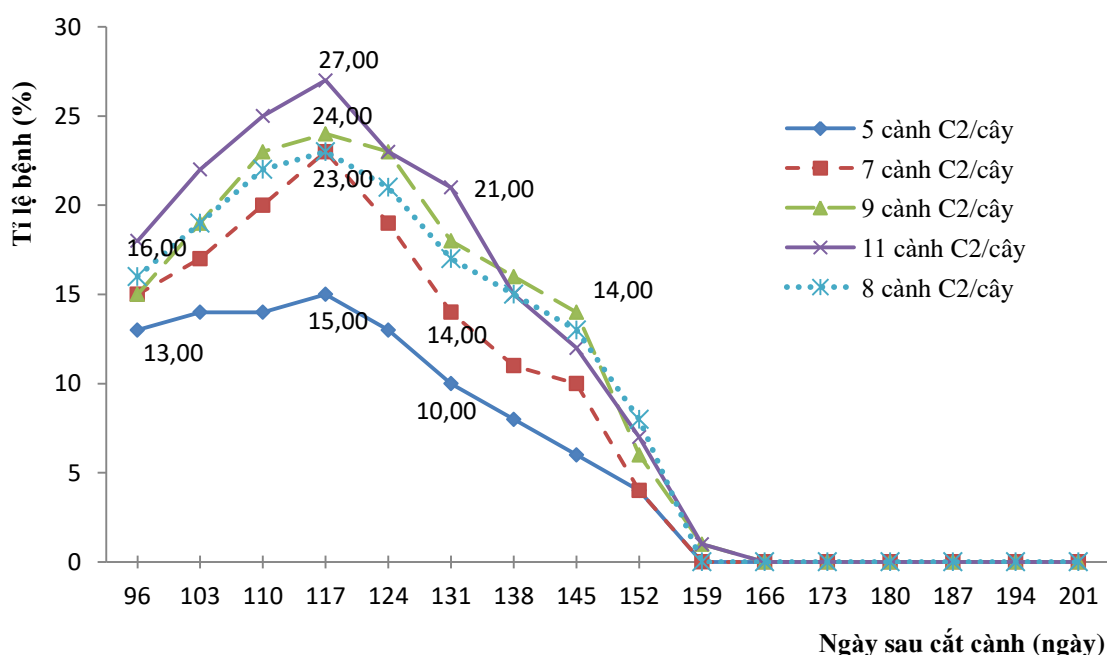
định mẫu nấm gây bệnh phấn trắng trên táo tại Ninh Sơn - Ninh Thuận là *Oidium heveae* và có giai đoạn hữu tính là *Erysiphe quercicola*.

So sánh 13 trình tự đoạn gen của 4 loài nấm khác nhau từ Ngân hàng gen, mã

số Ngân hàng gen được đặt trong dấu ngoặc đơn. PT.NTVN 22 là mẫu nấm gây bệnh phấn trắng trên táo ở Ninh Thuận. Giá trị tại các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1.000 lần lặp) (chỉ ghi những giá trị lớn hơn 80%).

3.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật đốn tỉa táo đến sự phát sinh, gây hại của bệnh phấn trắng

3.2.1. Diễn biến tỉ lệ bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo ở các công thức đốn tỉa khác nhau



Hình 4. Diễn biến tỉ lệ bệnh phấn trắng gây hại quả táo ở các công thức đốn tỉa cành tại Ninh Thuận, năm 2020

Bệnh phấn trắng xuất hiện rất sớm, ngay sau khi có quả, bệnh xuất hiện, tồn tại và gây hại liên tục trong suốt vụ táo, đặc biệt gây hại nặng giai đoạn sau cắt cành 90 ngày đến 150 ngày. Bệnh phấn trắng gây hại nặng khi quả táo còn non (khoảng 100 - 130 ngày sau cắt cành) và sau đó, khi quả táo già và chín thì quả táo ít bị bệnh gây hại hơn.

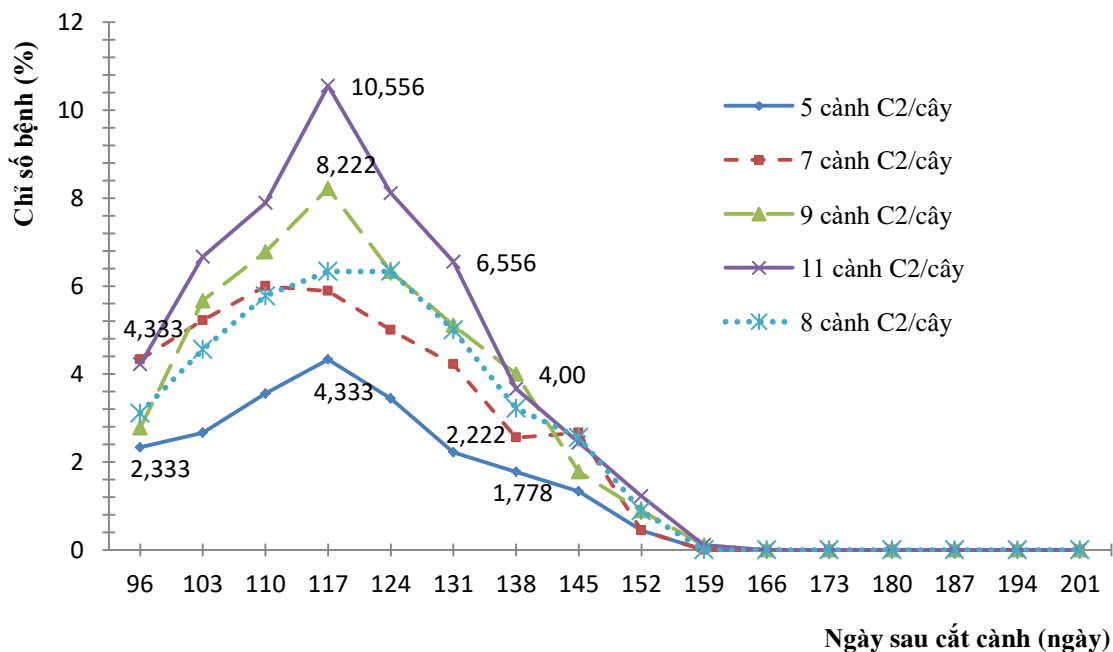
Các công thức thí nghiệm cắt cành đều bị bệnh phấn trắng gây hại. Tuy nhiên, ở công thức để lại 5 cành cấp 2 trên mỗi cây có tỉ lệ quả bị bệnh thấp nhất. Công thức cắt và để lại 11 cành cấp 2 mỗi cây có tỉ lệ bệnh phấn trắng gây hại cao nhất. Nhìn chung, mật độ cành càng cao thì xu hướng tỉ lệ bệnh phấn trắng gây hại càng cao. Khi đốn tỉa cành, để lại số lượng cành vừa phải (5 cành cấp 2/cây) đã tạo

được độ thông thoáng trên vườn táo, giúp giảm thiểu mức độ tỉ lệ gây hại của bệnh phấn trắng so với các công thức để mật độ cành cao.

3.2.2. Diễn biến chỉ số bệnh phấn trắng trên quả ở các công thức đốn tỉa cành táo

Tương tự như tỉ lệ bệnh, chỉ số bệnh phấn trắng hại táo trên công thức để 5

cành cấp 2/cây thấp nhất và công thức để 11 cành cấp 2/cây cao nhất trong suốt vụ. Nguyên nhân công thức đốn tỉa để lại 5 cành cấp 2/cây có chỉ số bệnh phấn trắng thấp nhất là do mật độ cành thấp đã tạo độ thông thoáng, ẩm độ thấp còn công thức để 11 cành cấp 2/cây có mật độ cành cao nên vườn táo có ẩm độ cao, thiếu ánh sáng trực xạ nên bệnh phấn trắng phát triển mạnh.



Hình 5. Diễn biến chỉ số bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo ở các công thức đốn tỉa cành tại Ninh Thuận, năm 2020

3.2.3. Đánh giá các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất và chất lượng táo ở các công thức đốn tỉa cành

Các công thức đốn tỉa cành khác nhau đã làm cho các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất táo có sự khác nhau. Mật độ quả của các công thức dao động từ 62,8 đến 79,4 quả/m². Trong đó, công thức để 5 cành cấp 2/cây có số quả/m² cao nhất và cao hơn có ý nghĩa với công thức để 9 cành

cấp 2/cây và công thức để 11 cành cấp 2/cây nhưng không có ý nghĩa với công thức để 7 và 8 cành cấp 2/cây. Công thức để 9 cành cấp 2/cây và công thức để 11 cành cấp 2/cây có quả/m² thấp nhất là do mật độ cành cao, lá dày dẫn đến thiếu ánh sáng, đồng thời bị bệnh phấn trắng gây hại nặng hơn nên quả bị rụng nhiều. Khối lượng quả của các công thức ít biến động hơn, dao động từ 77,6 - 79,6 g/quả.

Năng suất lý thuyết và năng suất thực thu của các công thức thí nghiệm dao động tương ứng từ 49,4 - 63,2 tấn/ha và 30,8 - 45,9 tấn/ha, mật độ cành càng cao, bệnh hại càng nặng và năng suất càng giảm. Trong đó, công thức đề 5 cành cấp 2/cây có năng suất lý thuyết cao nhất và cao hơn có ý nghĩa so với công thức đề 9 cành cấp 2/cây và công thức đề 11 cành cấp 2/cây. Năng suất thực thu dao động từ 30,8 - 45,9 tấn/ha. Trong đó công thức đề 5 cành cấp 2/cây có năng suất thực thu cao

nhất và cao hơn có ý nghĩa so với các công thức còn lại.

Độ Brix của quả táo của các công thức đốn tỉa khác nhau ít có sự sai khác nhau và biến động từ 10,1% đến 10,6%. Tuy nhiên, công thức đề 5 cành cấp 2/cây có độ ngọt cao nhất, độ Brix có xu hướng giảm khi đề mật độ cành tăng cao.

Tóm lại, công thức đề 5 cành cấp 2/cây giúp hạn chế tốt nhất bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo và đạt có năng suất táo cao nhất (45,9 tấn/ha).

Bảng 3. Các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất và chất lượng táo ở các công thức đốn tỉa cành tại Ninh Thuận, năm 2020

Công thức (số cành cấp 2/cây)	Số quả/m ²	Khối lượng quả (g)	Năng suất lý thuyết (tấn/ha)	Năng suất thực thu (tấn/ha)	Độ Brix (%)
5	79,4	79,6	63,2	45,9	10,6
7	76,8	78,9	60,6	41,7	10,1
8 (ĐC)	74,4	78,6	58,5	40,1	10,2
9	63,6	79,1	50,3	31,5	10,3
11	62,8	78,7	49,4	30,8	10,4
CV (%)	6,8	11,1	7,5	8,5	6,4
LSD _{0,05}	5,2	ns	4,6	3,5	ns

4. KẾT LUẬN

- Đã thu thập và xác minh vi sinh vật chính gây bệnh phấn trắng hại táo tại Nam Trung Bộ là do nấm *Oidium heveae* gây ra, giai đoạn hữu tính là *Erysiphe quercicola*. Bệnh phấn trắng gây thiệt hại chủ yếu trên quả táo non.

- Kỹ thuật đốn tỉa cành táo có ảnh hưởng đến phát triển và gây hại của bệnh phấn trắng. Trong đó, đốn tỉa đề 5

cành cấp 2/cây giúp hạn chế sự gây hại của bệnh phấn trắng và có năng suất cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Vũ Thị Thanh, 2008. Các loài nấm gây bệnh hại cây trồng ở Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp.
- Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Thuận, 2014. Sổ tay hướng dẫn kỹ thuật sản xuất táo an toàn tại Ninh Thuận. Dự án Hỗ trợ tam nông Ninh Thuận.

3. Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về phương pháp phát hiện dịch hại cây trồng. QCVN 01-38: 2010/BNNPTNT. Bộ NN & PTNT năm 2012.
4. Viện Bảo vệ thực vật, 1999a. Kết quả điều tra bệnh cây tại các tỉnh phía Nam. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Viện Bảo vệ thực vật, 1999b. Kết quả điều tra côn trùng và bệnh cây ăn quả ở Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp Hà Nội.
6. Doyle J. J., & Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12(13), 39 - 40.
7. White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., & Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315 - 322.

ABSTRACT

Study to identify the cause of powdery mildew and the influence of jujube branch density on the damage of powdery mildew disease in the Southern Central Coastal

*Powdery mildew is common disease on jujube in the South Central Coast. Research on the application of molecular biology to determine the causative agent and influence of pruning techniques on the harmfulness of the disease from 2020. The results show that the disease often causes damage on parts such as young fruit, flowers and leaves. In nature, the disease causes the most damage on young fruit. When the environment is favorable, the surface at the infected site will be covered with a white fungus. It has been identified that the causative agent of powdery mildew on jujube is caused by the fungus *Oidium heveae* and the sexual stage is *Erysiphe quercicola*. Pruning techniques have an effect on disease development and damage. The higher the density of branches on the plant, the more severe the damage caused by powdery mildew. In which, powdery mildew damages jujube the least when cutting and leaving 5 secondary branches on each plant, this is also the formula for the highest jujube yield in the experimental formulas (5, 7, 8, 9 and 11 branches per plant).*

Keywords: *jujube, powdery mildew, *Oidium heveae*, *Erysiphe quercicola*.*

BỆNH PHẤN TRẮNG (*Oidium heveae*) HẠI TÁO (Rhamnaceae: *Ziziphus mauritiana*) Ở CÁC THỜI VỤ CẮT CÀNH KHÁC NHAU TẠI NINH THUẬN

Mai Văn Hào¹, Nguyễn Văn Chính^{1*},
Phan Công Kiên¹, Phan Văn Tiêu¹, Võ Thị Kim Trâm¹,
Võ Đức Khá², Phạm Mỹ Liên³

¹Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển nông nghiệp Nha Hồ

²Chi cục Trồng trọt và BVTV Ninh Thuận

³Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

* E-mail liên hệ: chinh.nha.ho@gmail.com

TÓM TẮT

Bệnh phấn trắng (*Oidium heveae*) là bệnh hại chính trên cây táo tại Ninh Thuận. Điều kiện môi trường có tác động rõ rệt đến sự phát sinh, phát triển và gây hại của bệnh. Nghiên cứu thực hiện tại Ninh Thuận từ tháng 8/2020 đến 12/2021. Kết quả cho thấy, mức độ bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo khác nhau rõ rệt ở thời vụ cắt cành khác nhau. Trong đó, cắt cành táo vào tháng 5 và tháng 8 thì mức độ bệnh phấn trắng gây hại nặng hơn so với cắt cành vào tháng 2 và tháng 11, tỉ lệ bệnh cao nhất ở 115 ngày sau cắt cành tương ứng là 28% và 21% so với 16% và 15%; chỉ số bệnh tương ứng là 12,4% và 9,9% so với 4,4% và 4,3%. Đây cũng là hai thời vụ mà táo có năng suất thực thu cao nhất, tương ứng là 45,8 tấn/ha và 45,2 tấn/ha. Tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 2 (42,8 tấn/ha). Công thức cắt cành vào tháng 11 có năng suất thực thu thấp nhất, đạt 33,4 tấn/ha. Độ Brix của quả táo trên ruộng cắt cành vào tháng 2 cao nhất (13,2%), tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 8 (12,3%) và tháng 11 (11,8%), công thức cắt cành vào tháng 5 có độ Brix thấp nhất (10,1).

Từ khóa: cây táo, bệnh phấn trắng, *Oidium heveae*, thời vụ cắt cành.

1. MỞ ĐẦU

Cây táo đang dần trở thành cây trồng chủ lực của khu vực Nam Trung Bộ, trong đó Ninh Thuận là tỉnh có diện tích táo lớn nhất với 1.008 ha [5], Bình Thuận khoảng

90 ha (riêng ở Tuy Phong là 86,1 ha) [3], Khánh Hoà khoảng 50 ha (chủ yếu tập trung ở Tp. Cam Ranh) [4]. Trong những năm gần đây, việc áp dụng biện pháp quản lý tổng hợp ruồi và sâu đục quả táo đã giúp năng suất, chất lượng táo ngày càng tăng. Qua đó, đã giảm được lượng thuốc

Người phân biên: PGS.TS. Trần Thị Thu Hà

bảo vệ thực vật dùng trên cây táo, tạo được lòng tin với người tiêu dùng, thị trường trong nước. Từ đó, giá táo, hiệu quả kinh tế và diện tích trồng táo ngày càng tăng lên.

Trong thực tiễn sản xuất táo, ngoài ruồi và sâu đục quả thì bệnh phấn trắng là một trong những loài dịch hại nguy hiểm trên cây táo tại Ninh Thuận nói riêng và Nam Trung Bộ nói chung. Người trồng táo tại Ninh Thuận thường cắt cành táo hàng năm để cho thu hoạch vào các thời vụ tập trung theo ý muốn và thị trường. Có nhiều thời vụ cắt cành kéo dài trong suốt năm đang được người trồng táo áp dụng. Theo đó, ở từng thời vụ cắt cành, cây táo cũng chịu sự tác động mạnh mẽ của môi trường làm cho điều kiện tiểu khí hậu đồng ruộng có sự khác biệt theo. Điều kiện môi trường có tác động rõ rệt đến sự phát sinh, phát triển và gây hại của nấm bệnh, đặc biệt giai đoạn táo có quả non (giai đoạn rất mẫn cảm với bệnh phấn trắng). Biết rõ về khả năng, mức độ gây hại của nấm bệnh ở các thời vụ khác nhau giúp người trồng táo có giải pháp phù hợp để hạn chế thiệt hại do nấm bệnh gây ra. Tuy vậy, đến nay, chưa có công trình nào nghiên cứu về mức độ gây hại của bệnh phấn trắng trên cây táo ở các thời vụ cắt cành khác nhau tại Ninh Thuận làm cơ sở cho quản lý bệnh. Xuất phát từ những yêu cầu của thực tiễn đó, việc thực hiện nội dung nghiên cứu “Bệnh phấn trắng (*Oidium heveae*) hại táo (Rhamnaceae: *Ziziphus mauritiana*) ở

các thời vụ cắt cành khác nhau tại Ninh Thuận” là rất cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- *Thời gian*: từ năm 2020 đến 2021.

- *Địa điểm nghiên cứu*: các vùng trồng táo tại Ninh Thuận.

2.2. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu

- Giống táo đang được trồng tại Ninh Thuận.

- Các dụng cụ và thiết bị để điều tra, thu mẫu, túi thu mẫu, kính hiển vi, máy ảnh.

2.2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm gồm 4 công thức cắt cành ở các thời vụ khác nhau, bố trí ô lớn không lặp lại, mỗi ô có diện tích 1.000 m²:

Công thức 1: cắt cành táo trong tháng 2

Công thức 2: cắt cành táo trong tháng 5

Công thức 3: cắt cành táo trong tháng 8

Công thức 4: cắt cành táo trong tháng 11

Thực hiện thí nghiệm trên vườn táo đã vào thời kỳ cho quả ổn định. Các biện pháp kỹ thuật canh tác khác áp dụng theo Sổ tay hướng dẫn kỹ thuật sản xuất táo an toàn tại Ninh Thuận.

2.2.3. Phương pháp theo dõi thí nghiệm

Phương pháp theo dõi được áp dụng theo QCVN 01-38:2010 [2], có điều chỉnh

đủ phù hợp với cây táo tại Ninh Thuận. Điều tra bệnh phấn trắng từ giai đoạn đậu quả đến cuối vụ định kỳ điều tra 10 ngày/lần. Trên mỗi vườn điều tra 10 điểm ngẫu nhiên nằm trên đường chéo góc, mỗi điểm điều tra 10 quả rải đều trong ô, từ đó đánh giá tỉ lệ bệnh và chỉ số bệnh. Tỉ lệ bệnh A (%) = (Số quả bị bệnh/Số quả điều tra)*100.

Cấp bệnh trên quả:

n1: số quả bị bệnh ở cấp 1 với < 5% diện tích quả bị bệnh.

n3: số quả bị bệnh ở cấp 3 với > 5 - 10% diện tích quả bị bệnh.

n5: số quả bị bệnh ở cấp 5 với > 10 - 15% diện tích quả bị bệnh.

n7: số quả bị bệnh ở cấp 7 với > 15 - 20% diện tích quả bị bệnh.

n9: số quả bị bệnh ở cấp 9 với > 20% diện tích quả bị bệnh.

* *Chỉ tiêu theo dõi:* tỷ lệ bệnh (%), chỉ số bệnh (%), năng suất (tấn/ha).

* *Phương pháp xử lý số liệu:* xử lý số liệu bằng phần mềm Excel, MSTATC.

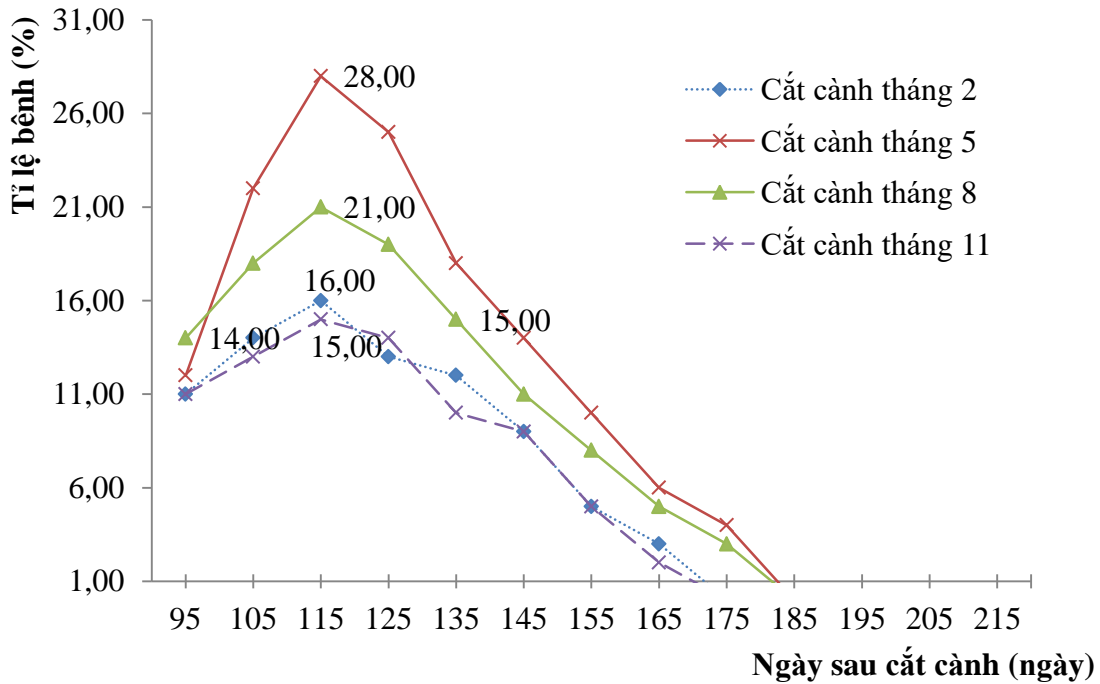
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Diễn biến tỉ lệ bệnh phấn trắng trên quả táo ở các thời vụ cắt cành khác nhau

Cây táo tại Ninh Thuận thường bị nhiều loại bệnh gây hại nhưng bệnh phấn trắng là nguy hiểm nhất. Bệnh phấn trắng gây hại chủ yếu trên quả táo còn non, ngay khi quả táo vừa được hình thành. Thời gian gây hại nặng kéo dài đến khi quả táo hình thành hạt. Đặc điểm của cây táo là ra hoa và đậu quả liên tục nên bệnh

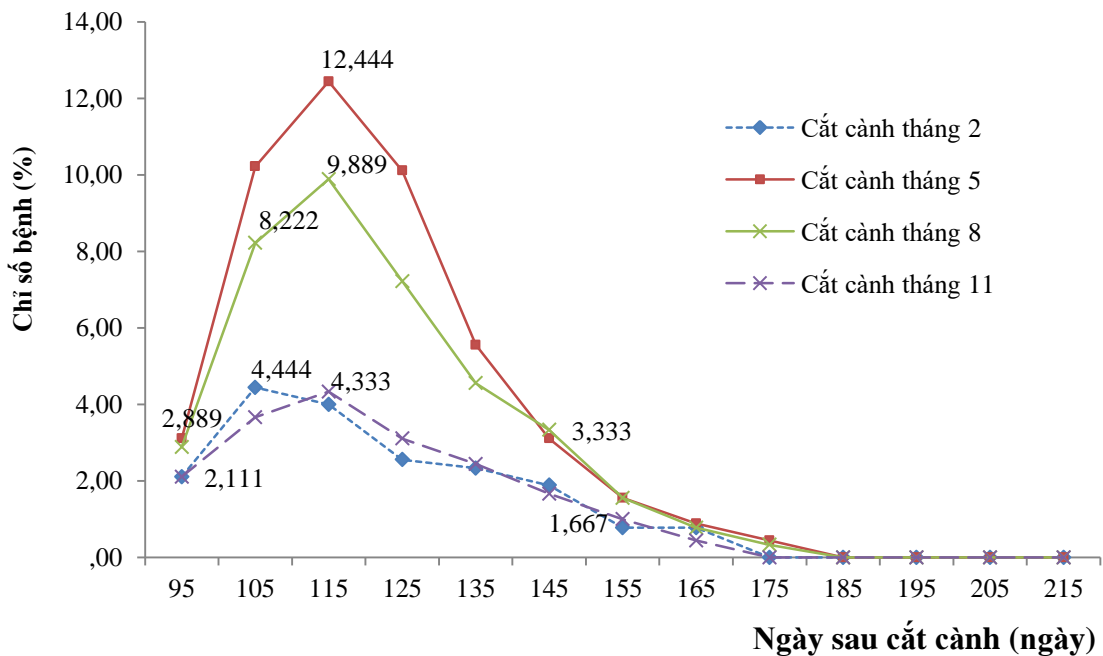
phấn trắng gần như tồn tại trên cây táo trong suốt cả vụ. Tuy nhiên, kỹ thuật canh tác táo tại Ninh Thuận chủ yếu là cắt cành táo triệt để (đốn đau), cho cành táo “bò” trên giàn và cho ra hoa, đậu quả tập trung nên bệnh phấn trắng gây hại trên quả cũng khá tập trung trong vụ, chủ yếu ở giai đoạn khoảng 95 - 135 ngày sau cắt cành (hình 1).

Kết quả theo dõi bệnh phấn trắng trên các công thức cắt cành ở các thời vụ khác nhau cho thấy bệnh phấn trắng gây hại nặng nhất trên công thức cắt cành vào tháng 5 và kế đó là ở công thức cắt cành tháng 8. Trong đó, tỷ lệ bệnh tăng cao dần ở giai đoạn 95 ngày sau cắt cành và cao nhất ở giai đoạn 115 ngày sau cắt cành. Công thức cắt cành táo vào tháng 5, quả bị bệnh phấn trắng gây hại nặng nhất với tỉ lệ bệnh cao nhất là 28% ở 115 ngày sau cắt cành. Tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 8 với tỉ lệ bệnh phấn trắng cao nhất ở kỳ theo dõi 115 ngày sau cắt cành là 21%. Ở thời gian này, cây táo của 2 công thức cắt cành tháng 5 và tháng 8 cho quả non nhiều trong thời gian mùa mưa, tạo điều kiện thuận lợi cho nấm bệnh phát sinh, phát triển và gây hại. Hai công thức cắt cành táo vào tháng 11 và tháng 2, tỉ lệ quả táo bị bệnh phấn trắng gây hại tương đương nhau với tỉ lệ bệnh cao nhất chỉ đạt 15% và 16%. Sau 115 ngày sau cắt cành, số quả táo non phù hợp cho nấm gây hại giảm dần nên tỉ lệ bệnh hại cũng giảm dần ở tất cả các công thức cho đến cuối vụ (175 - 185 ngày sau cắt cành).



Hình 1. Diễn biến tỉ lệ bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo của các công thức thí nghiệm tại Ninh Thuận, năm 2020 - 2021

3.2. Diễn biến chỉ số bệnh phấn trắng trên quả táo ở các thời vụ cắt cành khác nhau



Hình 2. Diễn biến chỉ số bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo của các công thức thí nghiệm tại Ninh Thuận, năm 2020 - 2021

Tương tự tỉ lệ bệnh, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy chỉ số bệnh phần trắng hại quả táo cao nhất trên công thức cắt cành vào tháng 5, tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 8. Ở hai thời vụ cắt cành vào tháng 11 và tháng 2, mức độ gây hại của bệnh khá thấp và chỉ số bệnh hại tương đương nhau. Trong đó, cắt cành vào tháng 5 bị bệnh phần trắng gây hại nặng nhất với chỉ số bệnh đạt 12,4%, tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 8 với chỉ số bệnh cao nhất với 9,9% ở kỳ theo dõi 115 ngày sau cắt cành (hình 2). Hai công thức cắt cành vào tháng 11 và tháng 2 có chỉ số bệnh phần trắng gây hại trên quả thấp nhất, tương ứng là 4,4% và 4,3%. Có thể thấy, mức độ gây hại của bệnh phần trắng tập trung cao nhất ở giai đoạn có nhiều

quả táo còn non (từ 95 đến 145 ngày sau cắt cành).

Nhìn chung, kết quả nghiên cứu lần đầu tiên về mức độ gây hại của bệnh phần trắng trên cây táo ở các thời vụ cắt cành khác nhau tại Ninh Thuận. Bệnh phần trắng gây hại trên quả táo nặng nhất trên công thức cắt cành vào tháng 5, tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 8. Đây là hai thời vụ mà táo có quả non trong mùa mưa nên cần đặc biệt lưu ý theo dõi và kịp thời xử lý nguồn bệnh, tác động các kỹ thuật quản lý bệnh hiệu quả nhằm hạn chế ảnh hưởng đến năng suất, chất lượng táo. Hai công thức cắt cành vào tháng 2 và tháng 11, cây táo có quả non vào thời gian ít mưa, khí hậu khô nóng nên ít bị bệnh phần trắng gây hại nhất.

3.3. Các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất và chất lượng táo ở các thời vụ cắt cành khác nhau

Bảng 1. Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất táo ở các thời vụ cắt cành khác nhau tại Ninh Thuận, năm 2020 - 2021

Thời vụ cắt cành	Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất táo				Độ Brix (%)
	Số quả/m ² (quả)	Khối lượng quả (g)	Năng suất lý thuyết (tấn/ha)	Năng suất thực thu (tấn/ha)	
Tháng 2	95,9	72,4	69,4	42,8	13,2
Tháng 5	95,2	74,6	71,0	45,8	10,1
Tháng 8	90,7	75,1	68,1	45,2	12,3
Tháng 11	83,7	71,1	59,5	33,4	11,8
CV (%)	11,1	9,3	11,7	-	8,3
LSD _{0,05}	6,7	3,1	2,5	-	1,6

Kết quả đánh giá các chỉ tiêu năng suất và chất lượng táo ở các thời vụ cắt cành khác nhau cho thấy, mật độ quả khác nhau ở công thức có thời vụ cắt cành khác nhau. Công thức cắt cành vào tháng 2 có

mật độ quả cao nhất (95,9 quả/m²), tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 5 (95,2 quả/m²), công thức cắt cành vào tháng 11 có mật độ quả thấp nhất (83,7 quả/m²). Khối lượng quả của công thức

cắt cành trong tháng 8 lớn nhất (75,1 g/quả), tiếp đến là công thức cắt cành tháng 5 (74,6 g/quả), công thức cắt cành tháng 2 (72,4 g/quả) và công thức cắt cành tháng 11 nhỏ nhất (71,4 g/quả).

Năng suất lý thuyết của công thức cắt cành trong tháng 5 là cao nhất (71,0 tấn/ha) và công thức cắt cành vào tháng 2 (69,4 tấn/ha), công thức cắt cành vào tháng 8 (68,1 tấn/ha) và cao hơn có ý nghĩa so với công thức cắt cành vào tháng 11 (59,5 tấn/ha).

Năng suất thực thu của công thức cắt cành trong tháng 5 và tháng 8 cao nhất lần lượt là 45,8 tấn/ha và 45,2 tấn/ha, tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 2 (42,8 tấn/ha). Công thức cắt cành vào tháng 11 có năng suất thực thu thấp nhất (33,4 tấn/ha). Tuy cắt cành vào tháng 5 và tháng 8 bị bệnh phấn trắng gây hại nặng hơn cắt cành vào tháng 2 và tháng 11 nhưng lại có năng suất cao hơn vì ít bị ruồi đục quả gây hại hơn.

Độ ngọt của công thức cắt cành vào tháng 2 cao nhất (Brix = 13,2%), tiếp đến là công thức cắt cành vào tháng 8 (12,3%) và tháng 11 (11,8%), công thức cắt cành vào tháng 5 có độ Brix thấp nhất (10,1).

Tóm lại, sản xuất táo tại Ninh Thuận có nhiều đặc điểm canh tác đặc thù so với các vùng miền khác của nước ta. Táo thường được cắt cành triệt để để cho vụ thu hoạch tập trung và người dân thường cắt cành rải vụ trong suốt năm phụ thuộc vào thị trường, chất lượng, năng suất táo. Cây táo tại đây cũng được làm giàn và buộc cành xếp lớp nên việc quản lý bệnh

phấn trắng có những kỹ thuật riêng. Người trồng táo cần đặc biệt lưu ý ở các thời vụ cắt cành mà giai đoạn quả táo non rơi vào thời gian mưa nhiều, độ ẩm không khí cao, khí hậu không quá khô nóng thì cần theo dõi và xử lý nguồn nấm bệnh, tia cành để vườn táo được thông thoáng.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

1) Bệnh phấn trắng gây hại trên quả táo tập trung chủ yếu ở giai đoạn khoảng 95 - 135 ngày sau cắt cành, cao nhất ở 115 ngày sau cắt cành.

2) Bệnh phấn trắng gây hại nặng nhất trên vườn táo cắt cành táo vào tháng 5, kế đó là cắt cành vào tháng 8, cắt cành vào tháng 2 và tháng 11 bệnh gây hại ít hơn. Tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh cao nhất ở các thời vụ cắt cành tháng 5; tháng 8; tháng 2; tháng 11 tương ứng là 28% và 12,4%; 21% và 9,9%; 16% và 4,4%; 15% và 4,3%.

4.2. Đề nghị

1) Ở các thời vụ cắt cành vào tháng 5 - tháng 8 (thời vụ mà giai đoạn quả táo non rơi vào thời gian mưa nhiều, độ ẩm không khí cao, khí hậu không quá khô nóng) thì cần theo dõi và xử lý nguồn nấm bệnh, tia cành để vườn táo được thông thoáng.

2) Cắt cành táo vào giai đoạn tháng 11 - tháng 2 để hạn chế bệnh phấn trắng gây ra trong trường hợp giá dự báo giá bán táo và hiệu quả kinh tế cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Thuận, 2014. Sổ tay hướng dẫn kỹ thuật sản xuất táo an toàn tại Ninh Thuận. Dự án Hỗ trợ tam nông Ninh Thuận.
2. Quy chuẩn Kỹ thuật Quốc gia về phương pháp phát hiện dịch hại cây trồng. QCVN 01-38: 2010/BNNPTNT. Bộ NN & PTNT năm 2012.
3. Phòng Nông nghiệp và Phát triển nông thôn huyện Tuy Phong, 2023. Báo cáo tổng kết lĩnh vực nông nghiệp và thủy sản năm 2022, phương hướng và nhiệm vụ năm 2023. Báo cáo số: 14/BC - NNPTNT tại Hội nghị ngày 10/3/2023.
4. Bùi Văn Bình, Mai Xuân Thương, Cao Thị Trúc, 2019. Báo cáo kết quả đề tài cấp tỉnh: Ứng dụng quy trình kỹ thuật trồng táo theo tiêu chuẩn VietGAP tại xã Cam Thành Nam. Trung tâm Nông nghiệp công nghệ cao Khánh Hòa, Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài độc lập cấp tỉnh Khánh Hòa (Mã số đề tài: ĐT - 2016 - 40104-ĐT).
5. Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Ninh Thuận, 2022. Báo cáo tổng kết năm 2021 và triển khai kế hoạch năm 2022 Ngành Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Tài liệu Hội nghị.

ABSTRACT

Powdery mildew (*Oidium heveae*) disease on Ber (Rhamnaceae: *Ziziphus mauritiana*) pruned at different seasons in Ninh Thuan province

Powdery mildew (Oidium heveae) is the main damaging disease of Ber in Ninh Thuan. Environmental conditions in ber fields pruned at different seasons have a very clear impact on the growth and harm of the disease. The study was carried out in Ninh Thuan from August 2020 to December 2021. The results showed that the damage of powdery mildew on fruits of ber was significantly different at different cutting branches seasons. In which, when cutting branches in May and August, powdery mildew is more damaging than pruning in February and November. The highest disease rate at 115 days after pruning is 28% and 21%, respectively, compared with 16% and 15%; disease index was 12.4% and 9.9% compared to 4.4% and 4.3%, respectively. These are also the two cutting branches seasons with the highest yield, respectively 45.8 tons/ha and 45.2 tons/ha. Next is the cutting season in February with 42.8 tons/ha. When cutting branches in November, Indian jujube have the lowest yield, reaching 33.4 tons/ha. Brix of fruits in the pruned field in February was the highest (13.2%), followed by jujube cut in August (12.3%) and November (11.8%), jujube were pruning in May has the lowest Brix (10.1).

Keywords: *jujube/ber, powdery mildew, Oidium heveae, pruning season.*

TRÌNH TỰ VÙNG rDNA - ITS CỦA NẤM *Pestalotiopsis* spp., và *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH RỤNG LÁ ĐÓM TRÒN TRÊN CÂY CAO SU Ở VIỆT NAM

Nguyễn Đôn Hiệu^{1*}, Nguyễn Thị Kim Uyên¹,
Nguyễn Thị Thanh Trang¹, Nguyễn Ngọc Mai¹,
Nguyễn Phương Vinh¹, Đoàn Nhân Luân¹
và Nguyễn Anh Nghĩa¹

¹ Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam
* E-mail liên hệ: donhieurriv@gmail.com

TÓM TẮT

Bốn mươi bảy (47) mẫu phân lập (MPL) nấm *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL *Colletotrichum* spp., gây bệnh Rụng lá đốm tròn (*Pestalotiopsis*/Circular Leaf Spot) trên cây cao su ở Việt Nam đã được đã được định danh bằng kỹ thuật phân tích trình tự vùng rDNA-ITS. Sản phẩm khuếch đại vùng rDNA-ITS của 47 MPL nấm *Pestalotiopsis* spp. có cùng kích thước khoảng 550 bp, các đa hình đơn nucleotide xuất hiện ở nhiều vị trí trong trình tự vùng rDNA-ITS của các mẫu phân lập nấm cho thấy có sự đa dạng di truyền ở mức dưới loài. Trình tự vùng rDNA-ITS của 47 MPL *Pestalotiopsis* spp. có mức độ tương đồng 99,27 - 99,82% so với các mẫu nấm *Pestalotiopsis microspora* trên GenBank. Trong khi đó, sản phẩm khuếch đại vùng rDNA-ITS của 47 MPL nấm *Colletotrichum* spp. có cùng kích thước khoảng 550 - 580 bp. Các đa hình nucleotide xuất hiện ở nhiều vị trí trong trình tự vùng rDNA-ITS của các mẫu phân lập nấm cho thấy có sự đa dạng di truyền ở mức loài và đồng thời phân chia các mẫu nấm thành 3 loài riêng biệt. Trình tự vùng rDNA-ITS của những MPL nhóm 1 có mức độ tương đồng 99,48 - 100% so với các mẫu nấm *C. gloeosporioides*, những MPL nhóm 2 tương đồng 99,49 - 99,66% so với các mẫu nấm *C. siamense* và những MPL nhóm 3 tương đồng 100% so với các mẫu nấm so với các mẫu nấm *C. acutatum* trên GenBank.

Từ khóa: bệnh Rụng lá đốm tròn, cây cao su, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., rDNA-ITS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, từ tháng 10 năm 2021, một loại bệnh rụng lá có triệu chứng giống với bệnh *Pestalotiopsis*/Circular Leaf Spot

đang bùng phát tại các nước trồng cao su ở châu Á đã được phát hiện. Từ kết quả phân lập và tái lây nhiễm Koch's, bước đầu đã xác định được tác nhân gây bệnh là do phức hợp nấm *Pestalotiopsis* spp. và *Colletotrichum* spp., cùng gây ra

Người phân biện: PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc

(Nguyễn Đôn Hiệu và ctv., 2022). Kết quả khảo sát đặc điểm hình thái của 47 mẫu phân lập (MPL) *Pestalotiopsis* spp., và 47 MPL *Colletotrichum* spp. chưa thể xác định được mức độ loài của các MPL *Pestalotiopsis* spp., nhưng bước đầu xác định các MPL nấm *Colletotrichum* spp., thuộc hai loài *C. acutatum* và *C. gloeosporioides*. Do vậy, việc phân tích trình tự vùng rDNA-ITS của các mẫu nấm đã được thực hiện để nhận diện, phân nhóm đặc điểm di truyền của nấm bệnh ở mức độ loài, dưới loài góp phần hiểu rõ hơn về đặc điểm dịch tễ của tác nhân gây bệnh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Nguồn nấm: các nguồn nấm đơn bào tử (gồm 47 MPL *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL *Colletotrichum* spp.) được phân lập trên cây cao su tại huyện Thống Nhất, Định Quán, Cẩm Mỹ (tỉnh Đồng Nai), huyện Bù Đăng, Phú Riềng (tỉnh Bình Phước).

- Các thiết bị dụng cụ cần thiết cho quy trình nuôi cấy trong phòng thí nghiệm, thực hiện phản ứng PCR, điện di sản phẩm PCR và phân tích kết quả.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Định danh loài nấm bằng kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS:**

Phản ứng PCR khuếch đại gen vùng rDNA-ITS của mỗi mẫu nấm được thực hiện với cặp mồi đặc hiệu ITS1 (mồi xuôi) (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3')

và ITS4 (mồi ngược) (5' - TCCTCCGCT TATTGATATGC - 3') được mô tả bởi White và ctv. (1990). Thể tích cho mỗi phản ứng PCR là 25 µl gồm PCR buffer 1X [Tris - HCl 10 mM (pH 8,8 ở 25°C), KCl 50 mM, triton X-100 50 mM], MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM mỗi loại dNTP, 0,4 µM mồi mỗi loại, 0,5 U DNA Polymerase: GoTag^R Green Master Mix (Promega) và 25 ng DNA mẫu.

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy luân nhiệt (MJ Research PTC-100, USA) với nhiệt độ biến tính ban đầu là 94°C trong 2 phút, sau đó là 35 chu kỳ với nhiệt độ biến tính là 94°C trong 20 giây, nhiệt độ bắt cặp là 53°C trong 30 giây, nhiệt độ kéo dài là 72°C trong 30 giây và nhiệt độ kéo dài cuối cùng là 72°C trong 5 phút.

Kiểm tra đoạn DNA được khuếch đại bằng phương pháp điện di trên gel. Gel được quan sát dưới đèn UV và chụp ảnh bằng máy chuyên dụng (GelDoc-It-Imaging System UVP, USA). Kích thước của các đoạn DNA khuếch đại được so sánh với thang DNA chuẩn 100 bps.

Giải trình tự vùng rDNA-ITS: các sản phẩm PCR được thực hiện giải trình tự được giải trình tự bởi Công ty First BASE (Singapore) với hai mồi ITS1 và ITS4 (White và ctv., 1990).

Định danh loài nấm từ kết quả giải trình tự: kết quả giải trình tự của mỗi MPL được kiểm tra và hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.2.5 (Hall, 2013). Trình tự của các MPL được căn

chỉnh hàng bằng cách sử dụng Clustal W Multiple Alignment (Thompson và ctv., 1994) để tìm sự tương đồng giữa các nguồn nấm. Các trình tự đại diện của các MPL sẽ được so sánh bằng cách sử dụng BLAST alignment (Altschul và ctv., 1990) để nhận diện loài của các MPL được nghiên cứu và phân tích tính tương đồng của các trình tự với các loài có trình tự như trên cơ sở dữ liệu GenBank.

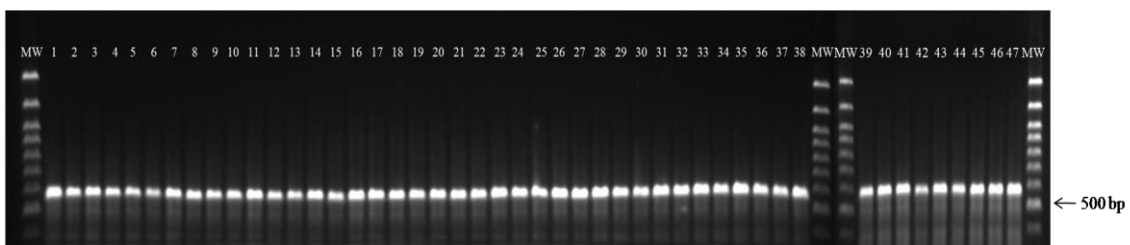
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhận diện và phân tích mối quan hệ di truyền của các MPL nấm *Pestalotiopsis* spp. dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS

Phản ứng PCR khuếch đại vùng rDNA-ITS của 47 MPL nấm *Pestalotiopsis* spp., dùng cặp mồi ITS1-ITS4 cho ra 1 sản phẩm PCR duy nhất gồm vùng ITS1-5,8S rDNA-ITS2 trong tất cả các MPL được nghiên cứu (hình 1). Kết quả giải trình tự khẳng định các đoạn ITS1-5,8S rDNA-ITS2 của 47 MPL có cùng kích thước khoảng 550 bp (hình 2). Xếp các trình tự vùng rDNA-ITS của 47 MPL

giống hệt nhau ngoại trừ 6 nucleotide khác nhau được phát hiện tại vị trí 104, 379, 382, 383, 384 và 441 trong vùng ITS1 và ITS2. Kết quả so sánh trình tự của 47 MPL nấm đã phân chia thành 3 nhóm riêng biệt. Nhóm 1 gồm 21 MPL nấm có cytosine (C) ở vị trí 379 và guanine (G) ở vị trí 383, 384; nhóm 2 gồm 21 MPL nấm có thymine (T) ở vị trí 379, adenine (A) ở vị trí 383 và guanine (G) ở vị trí 384; nhóm 3 gồm 5 MPL nấm có cytosine (C) ở vị trí 104, 382, 441.

Mức độ tương đồng giữa 3 MPL đại diện cho các phân nhóm di truyền gồm PesDN01 (nhóm 1), PesDN03 (nhóm 2), PesDN02 (nhóm 3) là 99,45 - 100%. Kết quả tìm kiếm sự tương đồng bằng công cụ BLAST cho thấy 3 MPL có độ tương đồng 99, 27 - 99,82% so với các mẫu nấm *Pestalotiopsis microspora* đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank. Như vậy, dựa trên trình tự vùng gen rDNA-ITS xác định *Pestalotiopsis microspora* là một trong những tác nhân gây bệnh rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Việt Nam.



Hình 1. Gel điện di sản phẩm PCR của 47 MPL nấm *P. microspora* dùng mồi ITS 1 và ITS 4 (ký hiệu MW là thang DNA chuẩn 100 bp (*Promega*). Nồng độ gel 1,0%, dung dịch điện di TBE buffer 1X, nguồn điện 70V, thời gian điện di 1 giờ 45 phút ở nhiệt độ phòng)

	100	110	380	390	400	410	420	430	440	450	460
1. PesDN01	ATAGGCTCTCTTAT		CTTCTCTTAGGAGTTG	AGTTCC	TGAATA	CAACGGCGGATTT	GTAGTATCCT	CTGAGCGTAGTA	AATTTTTT	TCTCGCTTTT	GTTAGGTGCT
2. PesDN02		C									
3. PesDN03											
4. PesDN04											
5. PesDN05											
6. PesDN06											
7. PesDN07											
8. PesDN08											
9. PesDN09											
10. PesDN10											
11. PesDN12											
12. PesDN13		C									
13. PesDN14											
14. PesDN15											
15. PesDN18											
16. PesDN19											
17. PesDN20											
18. PesDN21											
19. PesDN24											
20. PesDN25											
21. PesDN26											
22. PesDN27											
23. PesDN28											
24. PesDN29											
25. PesDN30											
26. PesDN31											
27. PesDN32											
28. PesDN33											
29. PesDN34		C									
30. PesDN35											
31. PesDN36											
32. PesDN37											
33. PesDN38											
34. PesDN39											
35. PesDN40											
36. PesPR01											
37. PesPR02											
38. PesPR03											
39. PesPR04											
40. PesPR05											
41. PesPR06		C									
42. PesPR07		C									
43. PesPR08											
44. PesPR09											
45. PesPR10											
46. PesPR11											
47. PesPR12											

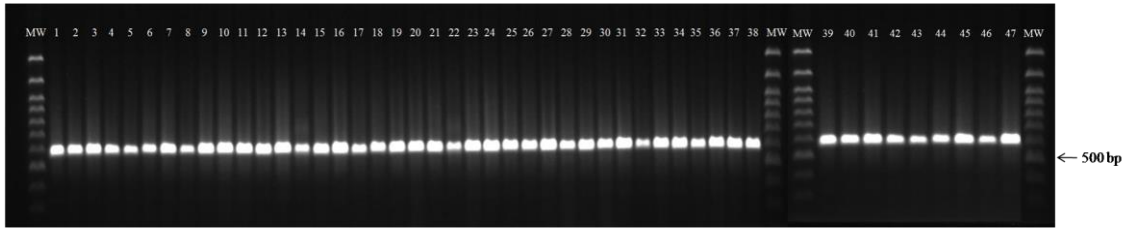
Hình 2. Sự khác biệt nucleotide trên nhiều vị trí trong vùng gen rDNA-ITS của 47 MPL nấm *P. microspora*.

3.2. Nhận diện và phân tích mối quan hệ di truyền của các MPL nấm *Colletotrichum* spp. dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS

Phản ứng PCR khuếch đại vùng rDNA-ITS của 47 MPL nấm *Colletotrichum* spp., dùng cặp mồi ITS1-ITS4 cho ra 1 sản phẩm PCR duy nhất gồm vùng ITS1-5,8S rDNA-ITS2 trong tất cả các MPL được nghiên cứu. Kết quả giải trình tự khẳng định các đoạn ITS1-5,8S rDNA-ITS2 của 47 MPL có cùng kích thước khoảng 550 - 580 bp (hình 3). Trình tự vùng rDNA-ITS của 47 MPL có nhiều nucleotide khác biệt tại nhiều vị trí đã được phát hiện, kết quả so sánh trình tự của 47 MPL nấm đã phân chia thành 3 nhóm riêng biệt (hình 4). Nhóm 1 gồm 13 MPL có cytosine (C) ở vị trí 57, 114 và thymine (T) ở vị trí 144, nhóm 2 gồm 24

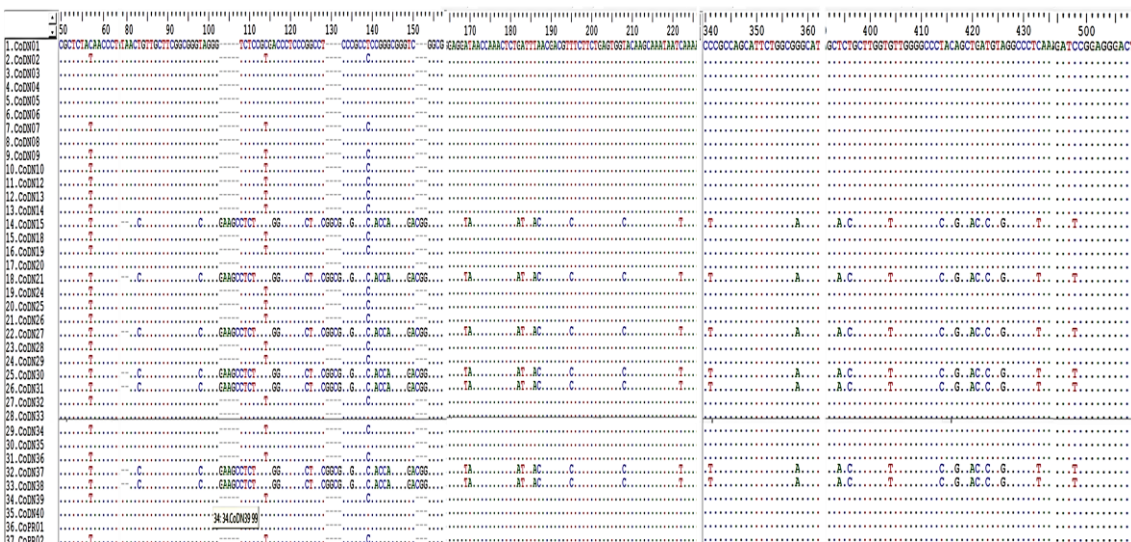
MPL có thymine (T) ở vị trí 57, 114 và cytosine (C) ở vị trí 144 và nhóm 3 gồm 10 MPL có cytosine (C) ở vị trí 83, 98 và nhiều vị trí khác biệt với nhóm 1 và nhóm 2.

Mức độ tương đồng giữa 3 MPL đại diện cho các nhóm di truyền gồm CoDN01 (nhóm 1), CoDN02 (nhóm 2), CoDN15 (nhóm 3) là 89,40 - 99,29%. Kết quả tìm kiếm sự tương đồng bằng công cụ BLAST cho thấy, CoDN01 (nhóm 1) có độ tương đồng 99,48 - 100% so với các mẫu nấm *C. gloeosporioides*, CoDN02 (nhóm 2) có độ tương đồng 99,49 - 99,66% so với các mẫu nấm *C. siamense*, CoDN15 (nhóm 3) có độ tương đồng 100% so với các mẫu nấm *C. acutatum* đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank. Như vậy, dựa trên trình tự vùng gen rDNA-ITS đã định danh được 3 loài nấm trong phức hợp nấm là tác nhân gây bệnh Rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Việt Nam.



Hình 3. Gel điện di sản phẩm PCR của 47 MPL nấm *Colletotrichum* sp. dùng mỗi ITS 1 và ITS 4

(Ký hiệu MW là thang DNA chuẩn 100 bp (*Promega*). Nồng độ gel 1,0%, dung dịch điện di TBE buffer 1X, nguồn điện 70V, thời gian điện di 1 giờ 45 phút ở nhiệt độ phòng)



Hình 4. Sự khác biệt nucleotide trên nhiều vị trí trong vùng gen rDNA-ITS của 47 MPL thuộc phức hợp loài nấm *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *C. acutatum*

3.3. Thảo luận

Hiện nay, có nhiều chỉ thị phân tử là công cụ hữu ích trong nhận diện và phân nhóm đặc điểm di truyền của nấm bệnh ở mức độ loài và dưới loài. Vì vậy, việc áp dụng kỹ thuật phân tử để định danh và nghiên cứu tính gây bệnh của các loài nấm *Pestalotiopsis* spp. và *Colletotrichum* spp. là rất cần thiết.

Giải trình tự vùng rDNA-ITS là một phương pháp rất hữu dụng để định danh và nghiên cứu quan hệ di truyền của nấm

(White và ctv., 1990). Vùng rDNA-ITS nằm giữa vùng SSU (Small Subunit DNA) và vùng LSU (Large Subunit DNA) với 2 vùng ITS1 và ITS2 (Internal Transcribed Spacer) và tiểu đơn vị 5,8S rDNA gene trong nhân. Trình tự vùng rDNA-ITS được ứng dụng rộng rãi để tìm ra mối quan hệ di truyền của các loài nấm, cũng như để phát hiện và định danh nấm (Kanbe, 2008; Abdel-Rahman, 2008). Trong những năm gần đây, kỹ thuật giải trình tự vùng rDNA-ITS đã được ứng dụng thành công trong nhiều

nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền nhiều loài nấm phân lập trên cây cao su và các cây ký chủ khác. Tất cả các đột biến SNPs trên vùng rDNA-ITS đều có giá trị thông tin quan trọng trong phân tích biến dị di truyền và xác định phân nhóm di truyền ở cấp độ dưới loài như kiểu đơn “haplotype” hoặc phân loại các nòi nấm.

Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích trình tự vùng gen rDNA-ITS đã xác định sự đa dạng di truyền của phức hợp nấm gây bệnh. Sự khác biệt giữa các nucleotide của 47 MPL nấm *Pestalotiopsis microspora* tại các vị trí 104, 379, 382, 383, 384, 441 đã phân chia chúng thành 3 phân nhóm dưới loài. Trong khi đó, trình tự nucleotide của 47 MPL nấm *Colletotrichum* spp., khác nhau tại nhiều vị trí, một số mẫu khác biệt hoàn toàn đã phân chia chúng thành 3 nhóm ở mức độ loài gồm phức hợp nấm *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum siamense* và *Colletotrichum acutatum*.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Có sự đa dạng về cấu trúc di truyền vùng rDNA-ITS của các mẫu nấm *Pestalotiopsis* spp. và *Colletotrichum* spp. gây bệnh Rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Việt Nam. Dựa trên trình tự vùng rDNA-ITS của các MPL nấm, xác định tổ hợp các loài nấm *P. microspora* (có 3 phân nhóm dưới loài) và 3 phức hợp loài *C. gloeosporioides*, *C. siamense* và *C. acutatum* là tác nhân gây bệnh.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử khác như SSR, ISSR, SRAP,... để nghiên cứu đặc điểm sinh học của các loài nấm này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403 - 410.
2. Benson A.D., Karsch M.I., Lipman D.J., Ostell J., and Wheeler D.L., 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research* 36: *Database issue*, pp: 25 - 30.
3. Hall T.A. 2013. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*; 41.
4. Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Thị Kim Uyên, Nguyễn Phương Vinh, Nguyễn Thị Thanh Trang, Nguyễn Ngọc Mai, Đoàn Nhân Luân, Bùi Thanh Tuấn, Trần Ánh Pha và Nguyễn Anh Nghĩa, 2022. Tác nhân gây bệnh Rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở tỉnh Đồng Nai và Bình Phước. Hội thảo Quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam, trang 183 - 190.
5. Thompson D.J., Higgins D.G. and Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673 - 4680.
6. White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols, a guide to methods and applications* (Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., and White T.J.). Academic Press, New York, pp. 315 - 322.

ABSTRACT

The sequence of the rDNA-ITS region of *Pestalotiopsis* spp. and *Colletotrichum* spp. fungi, causing Circular Leaf Spot disease on rubber trees in Vietnam

Forty-seven (47) isolates of *Pestalotiopsis* spp. and 47 isolates of *Colletotrichum* spp., causing *Pestalotiopsis*/Circular Leaf Spot on rubber trees in Vietnam were identified using rDNA-ITS region sequencing technique. The rDNA-ITS fragments from all 47 isolates of *Pestalotiopsis* spp., were in length with 550 bp, the single nucleotide polymorphisms (SNPs) occurring at some positions of these rDNA-ITS sequences revealed the genetic diversity at sub-species level and helped divide the isolates investigated into three clusters. The rDNA-ITS sequences of these isolates shared 99,27 - 99,82% of homology with the sequences of *P. microspora* from the GenBank. Meanwhile, the rDNA-ITS fragments from all 47 isolates of *Colletotrichum* spp., were in length of 550 - 580 bp, the nucleotide polymorphisms' sequences occurring at many position of them revealed the genetic diversity at species level and divided the isolates investigated into three species. The rDNA-ITS sequences of the isolates group 1 shared 99.48 - 100% of homology with the sequences of *C. gloeosporioides*, then the isolate group 2 contributed 99.49 - 99.66% of homology with the sequences of *C. siamense* and the isolate group 3 contributed 100% of homology with the sequences of *C. acutatum* from the GenBank.

Keywords: Circular Leaf Spot Disease, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., rubber tree.

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI NẤM *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH RỤNG LÁ ĐÓM TRÒN MỚI PHÁT HIỆN TRÊN CÂY CAO SU TẠI TỈNH ĐỒNG NAI VÀ BÌNH PHƯỚC

Nguyễn Đôn Hiệu^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Trang¹,
Nguyễn Thị Kim Uyên¹, Nguyễn Ngọc Mai¹,
Nguyễn Phương Vinh¹, Đoàn Nhân Luân¹
và Nguyễn Anh Nghĩa¹

¹ Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam

* E-mail liên hệ: donhieurriv@gmail.com

TÓM TẮT

Bốn mươi bảy (47) mẫu phân lập (MPL) nấm *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL *Colletotrichum* spp. gây bệnh Rụng lá đốm tròn (*Pestalotiopsis*/Circular Leaf Spot) trên cây cao su ở Việt Nam đã được phân tích đặc điểm hình thái trên môi trường nuôi cấy PDA (Potato Dextro Agar). Đặc điểm hình thái của 47 MPL *Pestalotiopsis* spp. có sự biến thiên về màu sắc tản nấm (trắng, đen, nâu nhạt), tốc độ tăng trưởng trung bình từ 11,1 - 15 mm/ngày, kích thước bào tử 18,0 μm - 26,1 μm x 5,6 μm - 7,4 μm và không có sự khác biệt đáng kể về hình dạng bào tử giữa những MPL nấm. Trong khi đó, đặc điểm hình thái của 47 MPL *Colletotrichum* spp. cũng có sự biến thiên về màu sắc tản nấm (cam, trắng), tốc độ tăng trưởng trung bình từ 7,7 - 12,5 mm/ngày, kích thước bào tử 12,5 μm - 16,1 x 3,8 μm - 5,2 μm (nhóm 1), 13,8 μm - 16,0 μm x 3,2 μm - 4,7 μm (nhóm 2) và có sự khác biệt rất lớn về hình dạng bào tử giữa những MPL nấm. Dựa vào đặc điểm hình thái, chưa thể xác định các MPL *Pestalotiopsis* spp. ở cấp độ loài, bước đầu có thể xác định 47 MPL nấm *Colletotrichum* spp. thuộc hai loài *C. acutatum* và *C. gloeosporioides*.

Từ khóa: bệnh Rụng lá đốm tròn, cây cao su, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, từ tháng 10 năm 2021, một loại bệnh rụng lá mới (gọi là bệnh Rụng lá đốm tròn) đã được phát hiện, triệu chứng bệnh giống với bệnh *Pestalotiopsis* (Circular Leaf Spot) đang bùng phát tại

các nước trồng cao su ở châu Á. Từ kết quả phân lập và tái lây nhiễm Koch's, bước đầu đã xác định được tác nhân gây bệnh Rụng lá đốm tròn trên cây cao su ở Việt Nam là do phức hợp nấm *Pestalotiopsis* spp. và *Colletotrichum* spp. cùng gây ra. Trong nghiên cứu này, đặc điểm hình thái của 47 mẫu phân lập

Người phân biệt: PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

(MPL) nấm *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL *Colletotrichum* spp. thu thập từ cây cao su trên nhiều vùng địa lý ở Việt Nam đã được khảo sát trên môi trường nuôi cấy nhân tạo PDA (Potato Dextro Agar). Kết quả nghiên cứu là nguồn dữ liệu cho các nghiên cứu về đa dạng di truyền, tuyển chọn thuốc trừ nấm, tuyển chọn giống cao su kháng bệnh và trên cơ sở đó góp phần hiểu hơn về đặc điểm dịch tễ học của loại bệnh mới này.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

Khảo sát đặc điểm hình thái của 47 *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL *Colletotrichum* spp. gây bệnh trên cây cao su.

2.2. Vật liệu

- Nguồn nấm: các nguồn nấm đơn bào tử (gồm 47 *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL *Colletotrichum* spp.) được phân lập trên cây cao su tại huyện Thống Nhất, Định Quán, Cẩm Mỹ (tỉnh Đồng Nai), huyện Bù Đăng, Phú Riềng (tỉnh Bình Phước).

- Các thiết bị dụng cụ cần thiết cho quy trình nuôi cấy trong phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm: theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại (ô cơ sở) gồm 3 đĩa petri.

- Thí nghiệm 1: gồm 47 nghiệm thức tương ứng với 47 MPL nấm *Pestalotiopsis* spp.

- Thí nghiệm 2: gồm 47 nghiệm thức tương ứng với 47 MPL nấm *Colletotrichum* spp.

Thực hiện: môi trường PSA sau khi hấp tiệt trùng được cho vào đĩa petri

(25 ml/đĩa) để nguội rồi tiến hành cấy mẫu nấm có đường kính 0,8 cm vào trung tâm đĩa, để ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 7 ngày. Các chỉ tiêu theo dõi:

- Quan sát màu sắc, hình thái sợi nấm và đo đường kính tản nấm (mm) của mỗi MPL. Đường kính tản nấm được đo cố định vào một thời điểm trong ngày cho đến khi có nghiệm thức mọc đầy đĩa petri.

- Quan sát hình thái và đo kích thước bào tử của mỗi MPL dưới kính hiển vi quang học (vật kính 40X) có kết nối với máy tính. Kích thước bào tử được xác định bằng cách đo chiều dài và chiều rộng của 15 bào tử được chọn ngẫu nhiên, sử dụng phần mềm Euromex Imagefocus alpha để chụp ảnh và đo kích thước.

- Phân loại nấm: dựa theo khóa phân loại của Sutton (1980); Damm và ctv. (2012).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái 47 MPL nấm *Pestalotiopsis* spp.

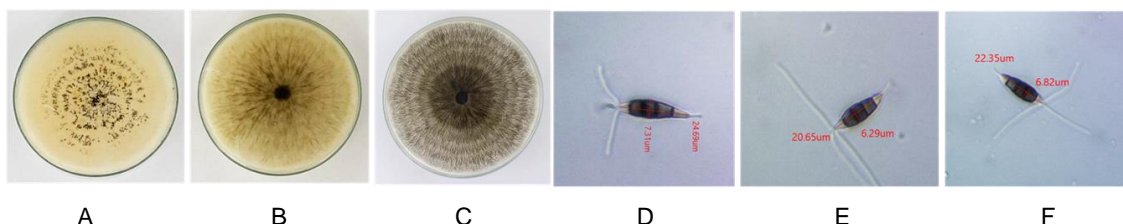
Tất cả 47 MPL *Pestalotiopsis* spp. đều sinh trưởng tốt trên môi trường PDA với tản nấm phát triển theo dạng hình tròn đồng tâm và phân bố đều, khuẩn ty mọc chìm hoặc mọc nhô cao lên khỏi bề mặt môi trường. Màu sắc tản nấm của các MPL *Pestalotiopsis* spp. có sự biến thiên lớn, từ trắng, đen đến nâu nhạt. Trong đó, tản nấm màu trắng chiếm đa số với tỉ lệ 55% (26 MPL), tản nấm màu đen chiếm tỉ lệ 24% (11 MPL) và tản nấm màu nâu nhạt là 21% (10 MPL). Tất cả MPL có tản nấm màu trắng được xếp vào nhóm có cấu trúc “dày, bông”, với khuẩn ty mọc nhiều, mọc bông lên khỏi bề mặt môi trường. Trong khi đó, các MPL có tản nấm màu đen và nâu nhạt được xếp vào nhóm có

cấu trúc “mỏng”, khuẩn ti mọc sát bề mặt môi trường nuôi cấy (hình 1).

Tốc độ tăng trưởng tản nấm trung bình và kích thước tản nấm ở thời điểm 6 ngày sau cấy có sự khác biệt ý nghĩa giữa các MPL *Pestalotiopsis* sp.. Phân tích trắc nghiệm đa đoạn Duncan tách các nguồn nấm ra thành nhiều nhóm. Tốc độ tăng trưởng trung bình của 47 MPL biến thiên từ 11,1 - 15 mm/ngày, tương ứng với kích thước tản nấm sau 6 ngày nuôi cấy từ 66,7 - 90 mm.

Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40X cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể về hình thái bào tử giữa 47 MPL nấm *Pestalotiopsis* spp.. Bào tử có dạng hình chùy đến hình thoi, rộng ở giữa và thuôn

nhọn về phía hai bên đầu, có hai đến ba phần phụ đỉnh và một phần phụ gốc. Bào tử có 5 tế bào phân chia bởi những vách ngăn, với ba tế bào trung tâm màu nâu đen, tế bào ở đỉnh và gốc trong suốt. Bào tử hình thành và tập trung thành những giọt dầu màu đen phân bố xung quanh mẫu cấy hoặc rải rác khắp bề mặt tản nấm. Thời gian hình thành bào tử giữa các MPL có sự khác biệt, trong đó nhóm tản nấm màu trắng và màu đen xuất hiện bào tử sớm hơn (7 - 10 ngày sau cấy) so với nhóm tản nấm màu nâu nhạt (20 ngày sau cấy). Kích thước bào tử trung bình của 47 MPL *Pestalotiopsis* sp. có sự khác biệt ý nghĩa, với chiều dài biến thiên từ 18,0 - 26,1 μm và chiều rộng biến thiên từ 5,6 - 7,4 μm .



Hình 1. Sự khác biệt về đặc điểm hình thái của các MPL nấm *Pestalotiopsis* spp. trên môi trường PDA

(A: tản nấm màu trắng (PesDN27); B: tản nấm màu nâu nhạt (PesDN06); C: tản nấm màu đen (PesDN08); D - F: hình dạng và kích thước bào tử của các MPL nấm (PesDN27, PesDN06, PesDN08))

3.2. Đặc điểm hình thái 47 MPL *Colletotrichum* spp.

Tất cả 47 MPL *Colletotrichum* spp. đều sinh trưởng tốt trên môi trường PDA với hình thái, cấu trúc và màu sắc tản nấm rất đa dạng, điểm dễ nhận biết nhất là hình dạng bào tử giữa các MPL có sự khác biệt rõ rệt. Quan sát bào tử dưới kính hiển vi ở vật kính 40X, có thể phân chia hình thái bào tử của các MPL *Colletotrichum* spp., thành 2 nhóm chính với những đặc tính khác nhau.

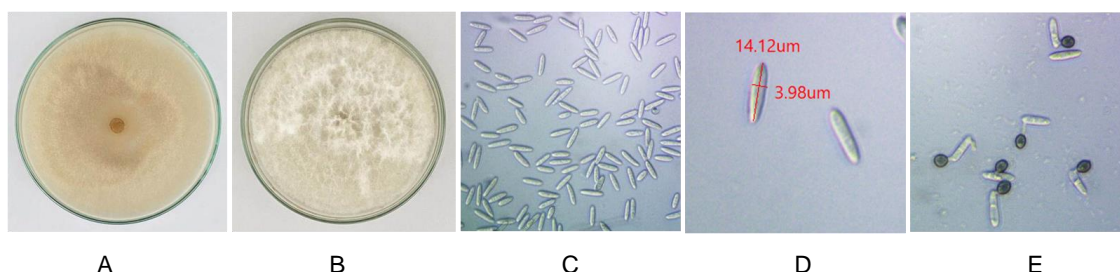
Nhóm bào tử dạng 1, gồm 9 MPL: bào tử phân sinh đơn bào, hình thoi, nhọn hai đầu, kích thước trung bình biến thiên từ 12,5 - 16,1 \times 3,8 - 5,2 μm . Ở điều kiện nhiệt độ và ẩm độ thích hợp, bào tử nảy mầm và hình thành giác bám sau 4 giờ. Tuy nhiên sau đó, tỉ lệ bào tử nảy mầm và hình thành giác bám tăng rất chậm trong 24 giờ quan sát. Giác bám có hình elip đến dạng trứng ngược, mép phẳng không chẻ thùy, lúc đầu không màu sau chuyển dần sang màu nâu, bên trong có nhiều chất

nhân phân bố bất định. Màu sắc tản nấm chủ yếu là cam và trắng. Tản nấm phát triển theo dạng hình tròn đồng tâm nhưng không rõ, phân bố không đồng đều. Ở điều kiện nhiệt độ 25°C, tốc độ tăng trưởng tản nấm trung bình biến thiên từ 7,7 - 12,5 mm/ngày tương ứng với kích thước tản nấm sau 7 ngày nuôi cấy từ 53,9 - 87 mm.

Nhóm bào tử dạng 2, gồm 38 MPL còn lại: bào tử phân sinh đơn bào, hình trụ thẳng, hai đầu tròn, hoặc một đầu tròn một đầu hơi nhọn, kích thước trung bình biến thiên từ 13,8 - 16,0 × 3,2 - 4,7 μm. Ở điều kiện nhiệt độ và ẩm độ thích hợp, bào tử nảy mầm sau 4 giờ và hình thành giác bám sau 8 giờ. Tỷ lệ bào tử nảy mầm và hình thành giác bám tiếp tục tăng cao trong thời điểm 24 giờ quan sát. Giác bám hình dạng hơi tròn hoặc không xác định, mép lượn sóng hoặc chẻ thùy, lúc đầu không màu sau chuyển dần sang nâu đến đen, bên trong có

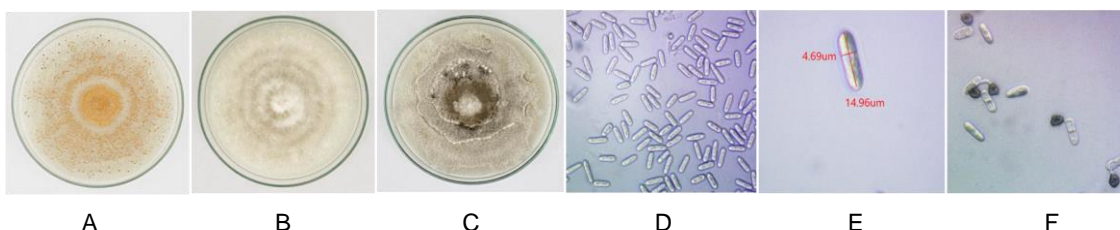
nhều chất nhân phân bố bất định. Màu sắc tản nấm biến thiên từ cam, trắng, đến xám. Tản nấm phát triển theo dạng hình tròn đồng tâm, khuẩn ti mọc chìm hoặc mọc nhô cao lên khỏi bề mặt môi trường. Hình thành đĩa cảnh màu cam và xám đen bên trên hoặc dưới bề mặt môi trường nuôi cấy. Ở điều kiện nhiệt độ 25°C, tốc độ tăng trưởng tản nấm trung bình của các MPL biến thiên từ 10,1 - 12,9 mm/ngày, tương ứng với kích thước tản nấm sau 7 ngày nuôi cấy từ 70,4 - 90 mm.

Dựa vào khóa phân loại chi nấm của Sutton (1980), kết hợp với những mô tả về đặc điểm hình thái tản nấm và hình dạng bào tử các loài *Colletotrichum* spp., của Damm và ctv. (2012), Weir và ctv. (2012), bước đầu có thể xác định 9 MPL thuộc nhóm 1 là loài *C. acutatum* (hình 2) và 38 MPL thuộc nhóm 2 là loài *C. gloeosporioides* (hình 3).



Hình 2. Hình thái tản nấm và bào tử loài *C. acutatum* trên môi trường PDA

(A: tản nấm màu cam (MPL CoDN38), B: tản nấm màu trắng (MPL CoPR10), C - E: hình dạng, kích thước bào tử và giác bám (MPL CoDN21))



Hình 3. Hình thái tản nấm và bào tử loài *C. gloeosporioides* trên môi trường PDA

(A: tản nấm màu cam (MPL CoDN01), B: tản nấm màu trắng (MPL CoDN08), C: tản nấm màu xám (MPL CoDN26), D - F: hình dạng, kích thước bào tử và giác bám (MPL CoDN08))

3.3. Thảo luận

Trong nghiên cứu này, hình dạng bào tử của 47 MPL nấm *Pestalotiopsis* spp. không có sự khác biệt đáng kể, tuy nhiên hình thái tản nấm lại có sự biến thiên lớn từ màu sắc (trắng, đen, nâu nhạt), cấu trúc sợi nấm (dày bông, mỏng mịn) đến tốc độ phát triển và kích thước tản nấm. Điều này cho thấy, các đặc điểm hình thái tản nấm không thể hiện sự liên quan đến hình thái bào tử, sử dụng phương pháp nghiên cứu hình thái không thể xác định được các MPL *Pestalotiopsis* spp. ở mức loài.

Theo khóa phân loại của Sutton (1980), Damm và ctv. (2012), đặc điểm hình thái của 47 MPL *Colletotrichum* spp. trong nghiên cứu này được xác định có thể thuộc hai loài *C. acutatum* (9 MPL) và *C. gloeosporioides* (38 MPL). Kết quả này khá tương đồng và phù hợp với kết quả nghiên cứu của Đặng Thị Thuyền (2007), xác định hai loài *C. gloeosporioides* và *C. acutatum* là tác nhân gây bệnh héo đen đầu lá trên một số dòng vô tính cao su tại vùng Đông Nam Bộ. Kết quả ghi nhận, loài *C. gloeosporioides* có tản nấm màu xám, bào tử đơn bào, trong suốt hình trụ tròn hai đầu hoặc 1 đầu tròn 1 đầu nhọn; kích thước $14,2 - 20,3 \times 4,3 - 6,6 \mu\text{m}$; giác bám màu nâu với hình dạng không xác định. Loài *C. acutatum* có tản nấm màu cam đến hồng, bào tử đơn bào, trong suốt hình thoi nhọn hai đầu; kích thước $18,1 - 20,1 \times 5,3 - 6,4 \mu\text{m}$, giác bám màu nâu và có hình trứng ngược. Theo Weir và ctv. (2012), loài *C. gloeosporioides* có đặc điểm hình thái tản nấm cũng như giác bám rất đa dạng và thay đổi. Bào tử phân sinh hình trụ thẳng, hai đầu tròn, kích thước dao động. Giác bám mọc đơn, màu nâu,

mép đều tới hơi chẻ thùy, hình tròn, hình cốc hơi thót về phía đỉnh và phình ra ở giữa. Đĩa cảnh chứa khối bào tử màu cam hoặc nâu đậm, từ đó mọc ra cành bào tử phân sinh và lông gai. Tản nấm có sợi khí sinh mọc thành bụi nhỏ, nhiều, màu cam, trắng đến xanh xám. Ở điều kiện nhiệt độ 28°C tốc độ phát triển của tản nấm đạt $6,58 - 11,5 \text{ mm/ngày}$. Theo Damm và ctv. (2012), đặc điểm hình thái chính của loài *C. acutatum* (trên môi trường SNA): không hình thành đĩa cảnh và lông gai trên môi trường. Bào tử phân sinh đơn bào, hình trụ hoặc thoi, hai đầu thót nhọn, kích thước $12,6 \pm 1,8 \times 3,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Giác bám mọc đơn, màu nâu, mép bằng đôi khi lượn sóng, hình tròn tới elip hoặc hình trứng ngược. Tản nấm (trên môi trường OA) phẳng, mép bằng, màu xám tro tới đỏ nâu.

Việc xác định tên các loài nấm *Colletotrichum* spp. chỉ dựa vào kết quả khảo sát hình thái đôi khi dẫn đến những kết quả thiếu chính xác do sự phụ thuộc cao của đặc điểm hình thái với điều kiện môi trường nuôi cấy. Hiện nay, có nhiều chỉ thị phân tử là công cụ hữu ích trong nhận diện và phân nhóm đặc điểm di truyền của nấm bệnh ở mức độ loài và dưới loài. Vì vậy, việc tiếp tục áp dụng kỹ thuật phân tử để định danh và nghiên cứu tính gây bệnh của loài nấm này là rất cần thiết.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Có sự đa dạng về màu sắc, kích thước, hình dạng, sự phân bố tản nấm và hình thái bào tử của 47 MPL *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL *Colletotrichum* spp..

Dựa vào đặc điểm hình thái, chưa thể xác định các MPL *Pestalotiopsis* spp. thuộc loài nấm nào. Tuy nhiên, bước đầu có thể xác định 47 MPL nấm *Colletotrichum* spp. thuộc hai loài *C. acutatum* và *C. gloeosporioides*.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để định danh 47 MPL nấm *Pestalotiopsis* spp. và 47 MPL nấm *Colletotrichum* spp..

Tiếp tục khảo sát sâu hơn về đặc tính sinh học của các MPL nấm này để từ đó có những biện pháp quản lý bệnh Rụng lá đốm tròn trên cây cao su tại Việt Nam một cách hữu hiệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Johnston P.R., Weir B.S., Tan Y.P., Shivas R.G., and Crous P.W., 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73, 1 - 36.
2. Đặng Thị Thuyền, 2007. Nghiên cứu bệnh héo đen đầu lá do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra trên một số dòng vô tính cao su. Luận văn Thạc sĩ Khoa học nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, trang 27 - 79.
3. Sutton B.C., 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervula and Stromata. *Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK*, 696 pp.
4. Weir B.S., Johnston P.R., & Damm U., 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73, 115 - 180.

ABSTRACT

Morphological characteristics of *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp. causing Circular Leaf Spot disease newly detected on rubber trees in Dong Nai and Binh Phuoc province

Forty-seven (47) isolates of Pestalotiopsis spp., and 47 isolates of Colletotrichum spp., causing Pestalotiopsis/Circular Leaf Spot disease on rubber trees in Vietnam were analyzed for morphological features on PDA medium. Morphological characteristics of 47 Pestalotiopsis spp., isolates are varied in colony morphology that expressed in mycelium colour (white, black, light brown), mycelium average growth rate from 11.1 to 15 mm/day, conidia size 18.0 μm - 26.1 μm × 5.6 μm - 7.4 μm and there was no significant difference in conidia shape among the studied isolates. Meanwhile, the morphological characteristics of 47 Colletotrichum spp., isolates also had variation in mycelium colour (orange or white), mycelium average growth rate from 7.7 to 12.5 mm/day, conidia size 12.5 μm - 16.1 μm × 3.8 μm - 5.2 μm (group 1), 13.8 μm - 16.0 μm × 3.2 μm - 4.7 μm (group 2) and there was a great difference in conidia shape among the studied isolates. Based on morphological characteristics, the studied isolates of Pestalotiopsis spp., could not be identified at the species level, but the studied isolates of Colletotrichum spp., could initially be identified as C. acutatum and C. gloeosporioides.

Keywords: *Circular Leaf Spot Disease, Colletotrichum spp., Pestalotiopsis spp., rubber tree.*

BỆNH HÉO RŨ PANAMA (*Fusarium oxysporum* sp.) TRÊN CHUỐI Ở VIỆT NAM VÀ ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU

Trần Thanh Dũng^{1*}

¹ Khoa Thực phẩm, Trường Đại học Đông Á

* E-mail liên hệ: dungtt@donga.edu.vn

TÓM TẮT

Chuối (*Musa cavendishii*) là cây trồng có giá trị kinh tế cao và được xuất khẩu qua nhiều nước trên thế giới, đặc biệt là Trung Quốc. Kết quả tổng hợp tình hình bệnh vàng héo Panama trên chuối cho thấy, bệnh vàng héo Panama gây hại nghiêm trọng trên các vùng trồng chuối của Việt Nam. Các biện pháp quản lý tổng hợp bệnh vàng héo Panama đã được Cục Bảo vệ thực vật công bố và nhiều biện pháp đã được áp dụng để hạn chế sự lây lan, phát triển của bệnh. Tuy nhiên, cho đến nay bệnh vàng héo Panama trên chuối vẫn đặc biệt nghiêm trọng và ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình sinh trưởng, phát triển, năng suất, giá trị thương phẩm. Từ đó, cần đưa ra những định hướng nghiên cứu nhằm hạn chế sự phát sinh, phát triển của bệnh.

Từ khóa: chuối, bệnh vàng héo, Panama, *Fusarium* sp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh héo rũ Panama (FOC) trên cây chuối đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam nghiên cứu. Tuy nhiên, đến nay bệnh Panama trên chuối vẫn đang là vấn nạn khắp thế giới trong đó có Việt Nam.

Bệnh Panama trên chuối do nấm *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* gây ra, bệnh có thể xuất hiện ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng của cây nhưng xuất hiện và gây hại nặng từ lúc vườn chuối được 3 năm trở lên. Bệnh làm cây chuối bị vàng héo ảnh hưởng đến chất lượng chuối trái và làm chết cây gây giảm năng suất nghiêm trọng.

Người phân biện: PGS.TS. Nguyễn Vĩnh Trường

Đặc biệt, hiện nay chuối già Nam Mỹ (*Cavendish banana*) được trồng và tiêu thụ mạnh mẽ trên thế giới, trong đó được trồng nhiều nhất tại Nam Mỹ, Ấn Độ và Philippines. Theo thống kê, tại Philippines có khoảng 450.000 ha trồng chuối, trong đó trên 70% diện tích là trồng chuối già Nam Mỹ. Mỗi trang trại thường có khoảng 5000 ha và tập trung chủ yếu ở Mindanao (Grahame Jackson, 2019; Sabine Altendorf, 2019). Và theo Che Palicte, khoảng 70% diện tích trồng chuối bị bệnh Panama và 10% bị phá hủy hoàn toàn buộc nông dân phải chuyển qua trồng bắp làm ảnh hưởng đến thu nhập của nông dân (Che Palicte, 2022).

Năm 2018, Tập đoàn Thaco (Việt Nam) đã mua lại toàn bộ diện tích trồng trọt của Tập đoàn Hoàng Anh Gia Lai tại Campuchia, trong đó hơn 2500 ha trồng chuối già Nam Mỹ tại Khu Liên hợp Snuol tỉnh Kratie, Campuchia, chủ yếu xuất khẩu qua Trung Quốc. Diện tích trồng chuối từ năm 2017 - 2018 có khoảng 1900 ha chiếm khoảng 74% diện tích trồng chuối. Bệnh héo vàng Panama bắt đầu xuất hiện đầu năm 2020 và đến năm 2021 đã tàn phá khoảng 85 ha chuối (Trần Thanh Dũng, 2023). Công ty đã thực hiện nghiêm ngặt việc quản lý bệnh, áp dụng nhiều biện pháp để hạn chế sự lây lan của bệnh, tuy nhiên theo báo cáo sản xuất của Công ty Thagrigo năm 2022 thì toàn bộ diện tích chuối trồng trên 3 năm đều bị Panama gây hại nặng và phải phá bỏ tương đương khoảng 2000 ha (Thagrigo, 2023).

Bắt đầu từ năm 2022, Thagrigo đã thực hiện việc sử dụng giống chuối cây mô kháng bệnh Panama được mua từ Việt Nam, Philippines, Trung Quốc như Vip 126 (VN), Baodao, Lâm thiên hoàng của Trung Quốc, G7 của Philippine. Tuy nhiên theo báo cáo của Phòng Kỹ thuật Công ty thì khi trồng lại trên đất đã phá bỏ thì các giống này cũng bị nhiễm bệnh (Phòng Kỹ thuật và Quản lý chất lượng, Công ty Thagrigo, 2023).

Tại Việt Nam, theo đánh giá của Trần Danh Sứ, có khoảng 150.000 ha trồng chuối, chiếm 19% diện tích trồng cây ăn trái trong cả nước. Hiện nay xu hướng đang chuyển qua trồng chuối già Nam Mỹ theo phương pháp trồng cây cây mô, tuy nhiên diện tích trồng chuối của nông dân còn nhỏ lẻ, chưa lập thành vùng chuối tập

trung sản xuất theo hướng công nghiệp (Trần Danh Sứ, 2017).

Năm 2016, Viện Nghiên cứu Rau quả (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam) đã điều tra hiện trạng bệnh héo vàng Panama trên cây chuối ở các tỉnh phía Bắc Việt Nam cho thấy, bệnh vàng lá Panama do nấm *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) gây hại trên các nhóm chuối gồm 3 chủng, dựa theo giống chuối chúng sử dụng làm vật chủ. Cụ thể là, Foc Race 1 (Foc 1), Foc Race 2 (Foc 2) và Foc Race 4 (Foc 4). Trong đó, Foc 4 có thể được chia thành hai chủng nhỏ hơn là Foc nhiệt đới 4 (Foc TR4) và Foc cận nhiệt đới 4 (Foc STR4) (Trần Ngọc Hùng, 2016).

Trong số tất cả các kiểu gen Foc, Foc TR4 được coi là loài chiếm ưu thế, mang tính hủy diệt nhất vì phạm vi vật chủ rộng hơn và khả năng sống sót để phát tán cao (chịu được nhiệt độ cao mạnh hơn). Foc TR4 dễ dàng qua mặt khả năng đề kháng của chuối Cavendish (Grahame Jackson, 2019) và giữa năm 2017 và năm 2019 Foc TR4 đã tìm thấy ở Lào, Việt Nam, Myanmar và Thái Lan (Sabine Altendorf, 2019).

Nghiên cứu của tác giả Lê Thị Loan và cộng sự cho thấy trong các mẫu chuối thu thập ở miền Bắc Việt Nam thì có khoảng 10% là do FOC TR4 (*F. odoratissimum*). Tuy nhiên, tác giả cũng cảnh báo năng suất chuối sẽ giảm 8% trong 5 năm đến sẽ mất khoảng 71% diện tích đất trồng chuối trong vòng 25 năm tới do tác hại của loại nấm *Fusarium* (Lê Thị Loan và cộng sự, 2022).

Từ những vấn đề trên, để đảm bảo được năng suất và chất lượng chuối, đặc

biệt là chuối xuất khẩu, các nhà khoa học Việt Nam cần thiết phải có định hướng nghiên cứu để quản lý bệnh héo vàng chuối do *Fusarium* sp. gây ra.

2. TRIỆU CHỨNG BỆNH VÀNG HÉO CHUỐI DO *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* GÂY RA

Nấm gây vàng lá Panama lưu tồn trong đất và các cây bệnh. Nấm có thể sống hoại sinh trong củ chuối và các bộ phận khác một thời gian dài, lây lan chủ yếu qua cây chuối con và đất có mang mầm bệnh. Nấm FOC xâm nhập chủ yếu qua chóp rễ hoặc các vết thương ở rễ. Sau khi xâm nhập, nấm sẽ phát triển trong bó mạch làm cho cây bị vàng héo và chết (Trần Danh Sửu và *ctv.*, 2017).

Triệu chứng đặc trưng của bệnh vàng héo chuối Panama (FOC) đã được nhiều tác giả mô tả.

Theo Vũ Thị Phương Bình, cây chuối bị nhiễm bệnh Panama thường có hiện tượng vàng từ lá già bên dưới sau lan dần lên các lá non. Triệu chứng vàng phát triển từ bìa lá và lan vào hướng gân lá. Lá bị bệnh thường héo, cuống gãy và lá treo trên thân già, đôi khi cuống lá cũng bị gãy ở phần giữa phiến lá. Trên các lá già bị héo khô quanh thân già, chỉ còn một số lá đọt xanh và mọc thẳng, các lá đọt này có màu xanh nhạt hay hơi vàng hoặc bị méo mó, nhăn nheo, cuối cùng bị héo úa. Cây bệnh chết nhưng thân không ngã đổ, các bẹ ngoài bị nứt dọc, các chồi con vẫn phát triển chung quanh nhưng sau đó cũng bị héo rụi. Cây bị héo rũ và chết dần. Riêng các bào tử nấm vẫn tồn tại, có thể làm đất trồng nhiễm bệnh trong hàng chục năm.

Cắt ngang thân già sẽ thấy các bó mạch bị đổi màu nâu vàng, cắt ngang thân thật (củ chuối) các mạch có màu đỏ nâu và bốc mùi hôi.



Hình 1. Bệnh vàng héo trên cây chuối do FOC gây ra tại Lai Châu

(Nguồn: Vũ Thị Phương Bình, 2021)

Theo tác giả Trần Danh Sửu, bệnh có thể xảy ra ở bất cứ giai đoạn sinh trưởng nào của cây. Các lá già bị vàng trước, rồi lan dần lên các lá non. Lá bị vàng từ bìa lá, rồi lan vào gân lá, lá bị héo. Cuống bị gãy nơi tiếp xúc với thân giả. Các lá còn xanh mọc thẳng, sau chuyển sang xanh vàng, nhăn nheo và cuối cùng cũng bị héo. Thân giả bị chết nhưng vẫn đứng, các bẹ ngoài bị nứt dọc thân, các chồi con vẫn phát triển nhưng sau đó héo rụi. Cắt ngang thân giả sẽ thấy ở các bẹ lá non nhất có mạch dẫn nhựa đổi màu vàng bên trong, các bẹ lá già có màu nâu bên ngoài.

Trong thân thật (củ chuối) có những đốm vàng, đỏ hoặc nâu. Chẻ dọc phần gốc của các rễ dẫn vào củ chuối có sọc đỏ.

Theo GS. Đường Hồng Dật, triệu chứng bệnh đầu tiên là các vết sọc màu vàng tối ở cuống lá già, lá chuyển màu vàng từ lá già đến lá non trong 3 tuần. Những lá ra sau thường biến dạng ở phiến lá. Hệ mạch dẫn trên thân và củ biến từ màu vàng tối sang màu đỏ tối, sau chuyển màu đen, rễ thối mục, cây chết, cây non cũng có thể bị nhiễm bệnh. Triệu chứng nhẹ có thể gặp ở vùng hơi lạnh (Đường Hồng Dật và *ctv.*, 2007).

Theo Luadir Gasparotto, khi nghiên cứu bệnh vàng héo Panama trên chuối ở Úc mô tả triệu chứng bệnh: lá dưới hoặc lá già bị vàng do các sợi nấm chặn các mô dẫn nước trong thân cây chuối. Các lá phía dưới vàng và rủ xuống giống như một cái “váy” xung quanh cây. Khi cắt ra, thân cây đổi màu từ vàng sang đỏ, sang nâu sẫm hoặc đen, tùy thuộc vào thời gian cây bị nhiễm bệnh (Luadir Gasparotto, 2022).

Bệnh héo vàng lá chuối xuất hiện và gây hại tập trung tại vùng chuối trồng từ 3 năm trở lên, các vùng trồng lâu năm thì tỉ lệ cây bị bệnh càng cao. Bệnh có thể phát sinh và gây hại trong bất kỳ giai đoạn sinh trưởng của cây chuối. Bệnh biểu hiện rõ nhất ở giai đoạn cây chuối ra hoa và phát triển quả non (Đặng Văn Mạnh, 2021). Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Trần Thanh Dũng khi điều tra tình hình gây hại của FOC trên chuối già Nam Mỹ tại Khu Liên hợp Snoul, Campuchia của Công ty Thagrigo Việt Nam (Trần Thanh Dũng, 2023).

Nấm bệnh lây lan chủ yếu qua hoạt động của con người (giống, dụng cụ, phương tiện) và qua dòng nước, cụ thể:

- Qua vật liệu trồng: nguồn bệnh lây lan mạnh qua cây giống được lấy từ khu vực đã bị nhiễm bệnh; giống nuôi cấy mô cũng có khả năng nhiễm bệnh nếu quy trình sản xuất không đảm bảo an toàn.

- Qua đất: nấm tồn tại trong đất và có thể sống nhiều năm ngay cả khi không có cây chuối, chúng có thể tồn tại trong xác thực vật (lá, thân, rễ) cây bị nhiễm bệnh dù cây đã chết; nấm lây lan từ nơi này sang nơi khác qua con người, động vật thông qua đất bám trên chân, giày dép, bánh xe, dụng cụ làm vườn,...

- Qua nước: bào tử nấm bệnh có thể trôi theo dòng nước chảy ra bề mặt như nước sông từ đầu nguồn chảy xuống cuối nguồn; nước tưới hoặc nước mưa chảy tràn từ cây này sang cây khác, từ vườn này sang vườn khác (Đặng Văn Mạnh, 2021).

3. TÌNH HÌNH BỆNH VÀNG HÉO PANAMA TRÊN CÂY CHUỐI TẠI VIỆT NAM VÀ CÁC BIỆN PHÁP PHÒNG TRỪ

3.1. Tình hình bệnh vàng héo Panama trên cây chuối tại Việt Nam

Hiện nay, chuối là cây trồng có tiềm năng xuất khẩu, mang lại giá trị kinh tế cao. Trung Quốc là thị trường tiêu thụ chính của Việt Nam.

Theo Tổng cục Thống kê, Việt Nam có khoảng 154.000 ha chuối. Các tỉnh đồng bằng Sông Cửu Long có 35.278,9 ha, Đồng Nai là địa phương có diện tích chuối lớn nhất với 13.149 ha, chiếm tỉ lệ 8,53% đứng đầu cả nước. Những năm gần đây, cây chuối bị bệnh vàng héo Panama gây hại nghiêm trọng, mặc dù chưa có kết quả điều tra cụ thể (Dương Châu, 2020). Đây là bệnh hại đặc biệt nghiêm trọng vì ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình sinh trưởng, phát triển, năng suất, giá trị thương phẩm.

Kết quả nghiên cứu của tác giả Lê Thị Loan, Nguyễn Thị Hồng Loan và cs., 2020 cho thấy bệnh héo vàng chuối Panama xuất hiện ở 20 tỉnh thuộc ba vùng là Tây Bắc, Đông Bắc, đồng bằng Sông Hồng và vùng Bắc Trung Bộ, tỉ lệ bệnh gây hại từ 15 - 30% (Vĩnh Phúc), thậm chí lên tới 90% (Khoái Châu, Hưng Yên), gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng chuối.

Kết quả nghiên cứu bệnh vàng héo Panama tại huyện Phong Thổ, tỉnh Lai Châu cho thấy, bệnh xuất hiện từ năm 2016 trên diện tích khoảng 1367 ha/3093 ha, trong đó bị hại nặng khoảng 307 ha

gây thiệt hại kinh tế cho nông dân (Vũ Thị Phương Bình, 2021).

Tại Thái Nguyên, bệnh vàng héo chuối Panama đã xuất hiện và gây hại nghiêm trọng tại xã Phúc Thuận, thị xã Phổ Yên; xã Quân Chu, huyện Đại Từ...

Tại Phú Yên, hiện có 200/600 ha chuối ở huyện Tuy An đang bị nhiễm bệnh héo rũ Panama. Tỉ lệ bệnh phổ biến từ 20 đến 30% cây; cá biệt có vùng tỉ lệ bệnh từ 70 đến 80% cây (Đặng Văn Mạnh, 2021).

Tại Thừa Thiên Huế, Quảng Nam, Lâm Đồng, Bình Dương bệnh vàng héo Panama cũng đã xuất hiện khá phổ biến, tuy chưa có đánh giá cụ thể về mức gây hại nhưng các Chi cục Bảo vệ thực vật và Trồng trọt các tỉnh đã chủ động đưa ra các biện pháp quản lý tổng hợp để hạn chế sự lây lan và phát sinh phát triển của bệnh.

3.2. Các biện pháp phòng trừ bệnh Panama

Nấm bệnh lưu tồn trong đất và các cây bệnh. Nấm có thể sống hoại sinh trong củ chuối và các bộ phận khác một thời gian dài. Do vậy, việc phòng trừ bệnh rất khó khăn và ít hiệu quả.

Các biện pháp quản lý dịch hại bệnh Panama trên cây chuối đã được Cục Bảo vệ thực vật, Bộ Nông nghiệp và PTNT ban hành tập trung vào các vấn đề như:

- Kiểm soát nguồn giống.
- Sử dụng giống sạch bệnh, giống kháng bệnh.
- Biện pháp canh tác:
- + Chọn đất trồng.

- + Bón phân.
- + Quản lý nước.
- + Vệ sinh đồng ruộng.
- + Luân canh cây trồng.
- Biện pháp sinh học.
- Biện pháp hóa học.

- Đào bỏ gốc những cây chuối bị bệnh, rải vôi vào hố cây bị bệnh và đem ra ngoài tiêu hủy.

Tuy nhiên, bệnh vẫn ngày càng phát triển mạnh mẽ và gây hại nghiêm trọng trên các vùng trồng chuối. Đặc biệt, đối với các trang trại trồng chuối xuất khẩu theo hướng công nghiệp do việc đào bỏ gốc và đem ra ngoài tiêu hủy cũng tiềm ẩn nguy cơ lây lan cao do việc đi lại của công nhân, rễ cây bên cạnh bị tổn thương. Bên cạnh đó, việc đào bỏ gốc đem ra ngoài sẽ làm rơi vãi đất và mầm bệnh trên đường đi, đồng thời với diện tích lớn thì việc đem các gốc và thân cây chuối ra ngoài lô sẽ tốn nhiều công và không khả thi.

Đối với vườn chuối có cây bị bệnh việc phun thuốc hóa học không có hiệu quả, mặc dù trong phòng thí nghiệm thuốc Ridomil 68 Gold hoặc Hecxa conazole, Tecbuconazole đều cho hiệu lực cao.

Kết quả nghiên cứu về quản lý bệnh vàng héo Panama trên chuối ở Khu Liên hợp Snuol, Campuchia của Công ty Thagrico đã đưa ra biện pháp như sau:

- Bước 1: thông báo toàn nông trường về dịch bệnh Panama và rào cách ly lô chuối bị bệnh. Làm cống vào lô, trước cống có máng nước chứa dung dịch thuốc tím 50 mg/lít nước (Viet Chem, 2019). Vệ sinh nương, rãnh để thoát nước.

- Bước 2: rào cách ly và xử lý các điểm bị bệnh trong lô.

```
* * * * *
* * * * *
```

Mương thoát nước (rải vôi)

```
* * * * *
* * * * *
```

Mương thoát nước (rải vôi)

```
* * * * *
* * * * *
```

Cắt hết tất cả các lá và ngọn của các cây trong khu vực cách ly, xắn bỏ tất cả các cây con. Xếp gọn phân bị cắt trong khu vực cách ly (Như vậy, nếu 1 cây bị bệnh thì sẽ chặt bỏ 6 cây)

- Bước 3: dùng thuốc trừ cỏ Glufosinate tiêm vào thân các cây chuối trong khu vực cách ly. Tiêm 4 bên cho mỗi cây, mỗi lần tiêm 20 ml.

- Bước 4: dùng vôi rải chung quanh gốc, mỗi gốc 2 kg và rải vôi lên các lá, ngọn chuối và cây chuối con (đã được xếp gọn trong khu vực cách ly). Phun thuốc trừ cỏ lên toàn bộ khu vực cách ly để diệt cỏ dại. Sau đó dùng dung dịch thuốc tím KMnO₄ (50 mg/lít nước) tưới vào xung quanh gốc chuối và khu vực cách ly, mỗi gốc khoảng 1 lít.

Dùng vôi rải 2 bên rãnh của khu vực cách ly để khi công nhân đi vào vùng đó sẽ được khử trùng tránh lây lan qua vùng khác.

- Bước 5: phun thuốc trừ nấm chung quanh vị trí cây bệnh khoảng 10 m. Pha 1 lít Anvil 5 SC (Hexaconazole) + 1 lít Aliette 800 WP (fosetyl-aluminium) với 600 lít nước, phun vào gốc cây, mỗi gốc khoảng 300 ml.

- Bước 6: sau 1 tuần tiến hành phun 1.0 kg *Trichoderma*/600 lít nước. Phun ướt

đều khu vực cách ly và trên các lá, ngọn chuối, cây chuối con đã xử lý trước đó. Phun quanh vị trí cây bệnh trong bán kính 10 m. Mỗi gốc 300 ml, phun từ gốc lên 50 cm. Phun 3 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày.

*** Chú ý:**

Các dụng cụ sau khi làm phải được khử trùng. Công nhân khi đi làm phải đeo găng tay, mang ủng và sau khi làm phải khử trùng đồ bảo hộ bằng thuốc tím và rửa tay bằng nước Javel trước khi ra khỏi lô chuối.

Tuy chưa hạn chế được sự lây lan của bệnh Panama nhưng biện pháp này đã tỏ ra có hiệu quả trong việc quản lý bệnh Panama ở tỉ lệ bệnh thấp trong thời gian dài.

Ở Philippines, việc phòng trừ bệnh không đào bỏ gốc như ở Việt Nam mà sẽ chặt ngọn những cây bị bệnh sau đó dùng rom hoặc gỗ để đốt vào chỗ cây bị bệnh và không bón phân, tưới nước cũng có tác dụng hạn chế sự lây lan của bệnh (Che Palicte, 2022).

Việc sử dụng giống kháng của Việt Nam (VIP 126), giống G7 của Philippines và các giống Baodao, Lâm thiên hoàng của Trung Quốc tại Khu L hợp Snuol cũng đang bị nhiễm bệnh.

Do vậy, cần phải có những nghiên cứu thật cụ thể để kiểm soát một cách tốt nhất bệnh vàng héo Panama trên cây chuối.

4. ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU VỀ QUẢN LÝ BỆNH VÀNG HÉO PANAMA TRÊN CÂY CHUỐI

4.1. Nghiên cứu về giống kháng bệnh

Các vùng trồng chuối cần xác định cụ thể chủng nấm *Fusarium* sp. gây hại và tạo giống kháng bệnh.

Tại Australia đã nghiên cứu thành công chuối chuyển gene kháng được các chủng FOC tuy nhiên đến năm 2024 Chính phủ Australia mới xem xét cho áp dụng (Luadir Gasparotto, 2022).

Tại Philippines cũng đã tạo ra được giống Cavendish 218 và Cavendish 219 có khả năng kháng được chủng FOC TR4 (Barnaby Lo, 2018).

Cần khuyến cáo nông dân sử dụng giống cây mô kháng bệnh để trồng.

4.2. Nghiên cứu biện pháp sinh học

Ngoài chủng nấm *Trichoderma harzianum* cần nghiên cứu và sản xuất thêm các tác nhân khác có khả năng ức chế sự phát triển của *Fusarium* sp.

4.3. Nghiên cứu về các nguyên tố vi lượng có khả năng tăng sức đề kháng của cây chuối

4.4. Nghiên cứu về biện pháp canh tác

Ngoài các vấn đề trong các biện pháp quản lý tổng hợp bệnh hại chuối thì cần nghiên cứu thêm biện pháp đào bỏ những cây chuối con vô hiệu sau khi cây mẹ được 3 tháng và đào bỏ bớt những cây chuối con hữu hiệu vì sẽ làm tổn thương bộ rễ của cây mẹ.

Cần xem xét lại biện pháp đào bỏ gốc cây bị bệnh và đem ra ngoài tiêu hủy trên những trang trại trồng chuối xuất khẩu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Thị Phương Bình, 2021. Một số kết quả nghiên cứu bệnh héo vàng hại cây chuối tây (bệnh Panama) tại huyện Phong Thổ, tỉnh Lai Châu, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, số 2/2021.

2. Barnaby Lo, 2018. Farmers in the Philippines fight to save bananas from deadly fungus, Reports from the banana plantations in the Southern Philippines.
3. Dương Châu, 2020. Bệnh héo rũ Panama, *Tạp chí Nông sản Việt*.
4. Che Palicte, 2022. DavNor banana farmers shift to corn due to Panama disease, *Philippine New Agence*.
5. Đường Hồng Dật, 2007. *Giáo trình Bệnh cây chuyên khoa*, Trường Đại học Nông nghiệp 1, Hà Nội.
6. Trần Thanh Dũng, 2023. Đánh giá về tình hình bệnh Panama (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* - FOC) trên cây chuối già Nam Mỹ canh tác tại Khu Liên hợp Nông nghiệp Snoul (Campuchia) và biện pháp quản lý, *Tạp chí Khoa học*, Đại học Đông Á, Vol 2, 01 (05).
7. Grahame Jackson, 2019. Panama disease tropical race 4, Banana-Philippine: (Mindanao), *Sydney NSW*, Australia.
8. Trần Ngọc Hùng, 2016. Bệnh vàng lá Panama trên cây chuối và giải pháp phòng trừ, Báo cáo Hội nghị lần thứ 10 Mạng lưới chuối châu Á - Thái Bình Dương tổ chức tại thành phố Quảng Châu (Trung Quốc), Viện Nghiên cứu Rau quả (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam).
9. Lê Thị Loan và cộng sự, 2022. Hiện trạng và thu thập bệnh héo vàng chuối ở miền Bắc Việt Nam, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*.
10. Luadir Gasparotto, 2022. Panama disease Tropical Race 4, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Australia.
11. Sabine Altendorf, 2019. Banana Fusarium Wilt Tropical Race 4, November 2019 edition of the FAO Food Outlook.
12. Đặng Văn Mạnh, 2021. Bệnh héo vàng lá chuối và biện pháp phòng trừ, Chi cục BVTV và Trồng trọt Phú Yên.
13. Phòng Kỹ thuật và Quản lý chất lượng, 2023. Báo cáo tình hình sử dụng giống kháng bệnh Panama trên chuối già Nam Mỹ tại KLH Nông nghiệp Snuol, Công ty Thagrico.
14. Trần Danh Sứ và ctv., 2017. Kỹ thuật trồng và chăm sóc cây chuối, Nxb. Hà Nội.
15. Thagrico, 2023. Báo cáo tình hình sản xuất năm 2022.

ABSTRACT

Panama wild disease (*Fusarium oxysporum*) of banana in Vietnam and research orientation in future

Banana (Musa cavendishii) is a crop with high economic value and exported to many countries around the world, especially China. Summary of Panama yellow wilt disease of bananas showed that this disease caused serious damage in areas in Vietnam. The integrated management of Panama yellow wilt disease has been announced by the Plant Protection Department and many measures have been applied to limit the spread and development of the disease. However, so far, banana yellow wilt disease is still serious and directly affects the growth, development, yield, and commercial value. From there, it is necessary to give research directions to limit the prevent and development of the disease in future.

Keywords: *Banana, yellow wilt disease, Panama, Fusarium sp.*

THÀNH PHẦN NẤM *Colletotrichum* GÂY BỆNH THÁN THƯ HẠI SẦU RIÊNG TẠI THÀNH PHỐ BUÔN MA THUỘT, TỈNH ĐẮK LẮK

Nguyễn Văn Nam^{1*}, Nguyễn Quốc Trung²,
Ngô Văn Anh³, Đào Thị Lan Hoa⁴, Đỗ Thị Kiều An¹

¹ Trường Đại học Tây Nguyên

² Lớp Khoa học cây trồng K2019, Trường Đại học Tây Nguyên

³ Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên

⁴ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

*E-mail liên hệ: ngvannamdhtn@gmail.com

TÓM TẮT

Sầu riêng (*Durio zibethinus* Murray) - “vua của các loại quả” - hiện đang được mở rộng diện tích trồng một cách nhanh chóng tại Đắk Lắk. Đây là một trong những điều kiện thuận lợi cho nhiều loại dịch hại phát sinh và gây hại cây sầu riêng, trong đó có bệnh thán thư gây ra bởi nấm *Colletotrichum* spp.. Nghiên cứu này nhằm xác định sự đa dạng về thành phần loài nấm gây bệnh thán thư sầu riêng. Kết quả nghiên cứu cho thấy triệu chứng bệnh thán thư trên lá sầu riêng khá đa dạng, với 3 triệu chứng điển hình khác nhau. Hai loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên lá sầu riêng tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk đã được định danh, đó là: *Colletotrichum fructicola* và *Colletotrichum gloeosporioides*. Trong đó, *Colletotrichum fructicola* lần đầu tiên được ghi nhận gây hại trên sầu riêng tại Việt Nam.

Từ khóa: *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, sầu riêng, thán thư.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sầu riêng (*Durio zibethinus* Murray) là loại cây ăn quả nhiệt đới có nguồn gốc từ Đông Nam Á, được mệnh danh là “vua của các loại quả” và rất được ưa chuộng nhờ hương vị thơm ngon và béo ngậy của quả. Đây là một trong những loại cây ăn quả chủ lực đem lại lợi ích kinh tế cao

cho người dân tại tỉnh Đắk Lắk nói riêng và khu vực Tây Nguyên nói chung.

Nhờ có điều kiện tự nhiên thuận lợi và giá trị kinh tế cao nên trong những năm gần đây, diện tích trồng sầu riêng tại Đắk Lắk tăng lên nhanh chóng, tăng từ hơn 6 nghìn ha năm 2018 lên đến 22.458 ha (2023). Diện tích trồng sầu riêng được mở rộng một cách nhanh chóng cũng là cơ hội

Người phân biên: PGS.TS. Nguyễn Văn Minh

thuận lợi cho nhiều loại dịch hại phát triển phong phú về chủng loại lẫn số lượng, trong đó có bệnh thán thư. Đây là một trong những loại bệnh phổ biến không chỉ trên sầu riêng mà còn trên nhiều loài cây trồng khác (Mai Văn Trị, 2022). Bệnh gây hại chủ yếu trên lá già và lá bánh tẻ. Vết bệnh thường bắt đầu xuất hiện ở chóp hoặc mép lá, sau đó các vết bệnh có thể liên kết lại với nhau và lan rộng dần vào giữa lá. Triệu chứng bệnh thán thư thường đặc trưng bởi các quầng đồng tâm và các ổ bào tử màu đen trên vết bệnh. Bệnh nặng làm cho lá bị khô hàng loạt và rụng dần, gây hiện tượng trơ trụi cành, khiến cho cây sinh trưởng và phát triển kém, dẫn đến làm giảm năng suất và chất lượng quả. Tác nhân gây bệnh thán thư là nấm *Colletotrichum* spp. và giai đoạn hữu tính là *Glomerella* (thuộc họ Glomerellaceae, bộ Sordariomycetidae, lớp Sordariomycetes, ngành Ascomycota). Nấm gây hại trên nhiều loại cây trồng khác nhau cả giai đoạn trước và sau thu hoạch (Cannon và cs., 2012). Đã có 280 loài có dữ liệu phân tử được chấp nhận trong chi này (Liu và cs., 2022). Tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu nào về sự đa dạng thành phần loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư hại sầu riêng tại Tây Nguyên nói chung.

Để có cơ sở cho việc phòng trừ bệnh thán thư hại sầu riêng, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định thành phần loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư hại sầu riêng tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập và phân lập nấm *Colletotrichum* spp.

- Mẫu lá cây sầu riêng có triệu chứng bị bệnh thán thư được thu thập tại các vườn sầu riêng tại địa bàn xã Hoà Thắng, phường Tân Lập và phường Tân Hòa, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk. Mẫu được giữ ẩm trong các túi nylon đã khử trùng, bảo quản lạnh và đem về phòng thí nghiệm.

- Phương pháp phân lập: nấm bệnh được phân lập theo phương pháp của Agrios (2005), làm thuần bằng phương pháp nuôi cấy đơn bào tử (Burgess *et al.*, 2005) trên môi trường PDA và áp dụng phương pháp nuôi cấy trên lame theo Waller *et al.* (1992) và lưu trữ trong điều kiện vô trùng. Các chủng nấm *Colletotrichum* spp. sau khi tách thuần được nuôi cấy trên môi trường PDA ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$ và 12 giờ sáng tối.

2.2. Định danh nấm *Colletotrichum* spp.

- **Định danh bằng hình thái:** nấm *Colletotrichum* được định danh bằng hình thái dựa vào đặc điểm của khuẩn lạc và bào tử nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA, dựa vào tài liệu của Sutton (1980) và Barnett & Hunter (1998).

- **Chủng nhiễm bệnh nhân tạo:** nấm *Colletotrichum* spp. được nuôi cấy trong đĩa petri trên môi trường PDA. Sau 5 ngày nuôi cấy, khi bào tử xuất hiện thì cho 10 mL nước cất vào mỗi đĩa nấm, dùng que trang thủy tinh đã khử trùng chà nhẹ trên bề mặt khuẩn lạc, lọc thu dung dịch huyền phù

bào tử nấm. Thu thập lá sầu riêng bánh tẻ khỏe mạnh từ vườn sầu riêng tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên để tiến hành lây bệnh nhân tạo. Dùng cồn 70° lau khử trùng lá, sau đó dùng kim khử trùng chích để tạo 6 vết thương phân bố đều trên lá. Lá sầu riêng sau đó được đặt trên lớp giấy thấm để giữ ẩm trong hộp đã khử trùng. Sau đó phun 10 mL dung dịch chứa 10^5 bào tử/mL đã chuẩn bị lên mặt sau của mỗi lá sầu riêng. Lá sầu riêng ở công thức đối chứng được phun 10 mL nước cất. Hộp đựng lá sầu riêng đã chủng nhiễm nấm được giữ ở điều kiện nhiệt độ phòng; ẩm độ trên 90%. Theo dõi kích thước và màu sắc vết bệnh phát triển theo thời gian.

- **Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử:** sau khi được định danh bằng hình thái, các mẫu nấm được gửi đi phân tích tại Phòng Thử nghiệm Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam

Khoa, quận 7, thành phố Hồ Chí Minh. Thực hiện ly trích DNA tổng số bằng GeneJET Plant Genomi cDNA Purification Kit (Thermo - Mỹ). Thực hiện phản ứng PCR Master Mix - Thermo với cặp mồi ITS1 - ITS4 và gửi mẫu giải trình tự gen. Trình tự gen được so sánh với cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen trong NCBI và phần mềm MEGA 6.0 để xây dựng cây phả hệ.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng bệnh thán thư trên lá sầu riêng tại Buôn Ma Thuột

Triệu chứng bệnh thán thư trên lá sầu riêng khá đa dạng về hình dạng, kích thước và đặc điểm. Ba dạng triệu chứng bệnh thán thư trên lá sầu riêng đã được ghi nhận trong các hình 1, 2, 3 và tóm tắt trong bảng 1.

Bảng 1. Các dạng triệu chứng bệnh thán thư trên lá sầu riêng tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk

Triệu chứng	Hình dạng	Kích thước	Đặc điểm
TT1	Bất định, có thể ở rìa lá hay chóp lá lan dần vào bên trong	Kích thước vết bệnh dao động 0,5 - 9 cm, trung bình 2 - 4 cm.	Vết bệnh liên kết tạo những mảng cháy màu nâu đỏ, rìa vết bệnh màu nâu đen, bề mặt lá có sự hiện diện của các ổ bào tử những hạt li ti màu đen.
TT2	Có các vòng đồng tâm, có thể ở chóp lá hay ở giữa lá	Vết bệnh có thể lan rộng, có kích thước 4 - 5 cm, kích thước trung bình là 2 - 4 cm.	Ổ bào tử thường to hơn so với TT1 và có thể nhìn thấy khá rõ bằng mắt thường.
TT3	Vết bệnh là những những đốm nâu nhỏ li ti phân bố khắp nơi trên lá.	Vết bệnh có kích thước rất nhỏ, 0,1 - 1 cm. Chúng có thể liên kết để tạo thành những vết bệnh rất lớn, lên đến 6 - 7 cm.	Trên vết bệnh xuất hiện các ổ bào tử li ti màu đen. Xung quanh vết bệnh có quầng màu vàng phân cách giữa mô bệnh và mô khỏe.



Hình 1. Triệu chứng bệnh thán thư TT1 trên lá sầu riêng






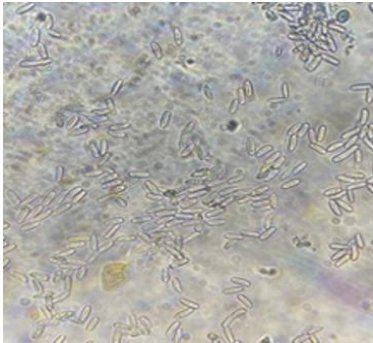
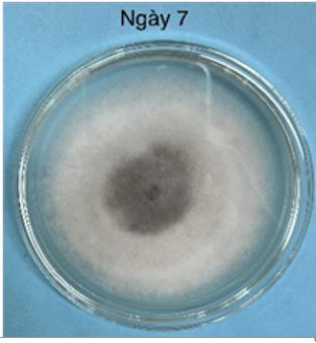
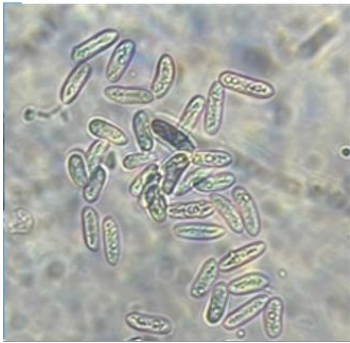
Hình 2. Triệu chứng bệnh thán thư TT2 trên lá sầu riêng



Hình 3. Triệu chứng bệnh thán thư TT3 trên lá sầu riêng

3.2. Đặc điểm hình thái của các dòng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư sầu riêng

Bảng 2. Đặc điểm hình thái các chủng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư sầu riêng tại Buôn Ma Thuột

Chủng nấm	Khuẩn lạc	Bào tử nấm
<i>Colletotrichum</i> sp.1	<p>Hệ sợi nấm mọc dày, xốp, màu trắng sữa lúc non, hệ sợi sau đó chuyển sang màu xanh đen.</p> <p>Ngày 7</p> 	<p>Bào tử đơn bào, hình trụ dài, 1 đầu tù, 1 đầu hơi nhọn, bên trong bào tử có các giọt dịch trong suốt.</p> 
<i>Colletotrichum</i> sp.2	<p>Hệ sợi nấm mọc dày, hình thành nhiều quầng đồng tâm rõ, màu xanh đen.</p> <p>Ngày 7</p> 	<p>Bào tử đơn bào hình trụ dài, 1 đầu tù, 1 đầu nhọn, bên trong có các giọt dịch trong suốt.</p> 
<i>Colletotrichum</i> sp.5	<p>Hệ sợi nấm mọc dày, trắng sữa, hình thành nhiều quầng đồng tâm màu đen xen lẫn hồng ở giữa và lan rộng dần ra.</p> <p>Ngày 7</p> 	<p>Bào tử đơn bào hình trụ dài, 1 đầu tù, 1 đầu nhọn. bên trong có các giọt dịch trong suốt.</p> 

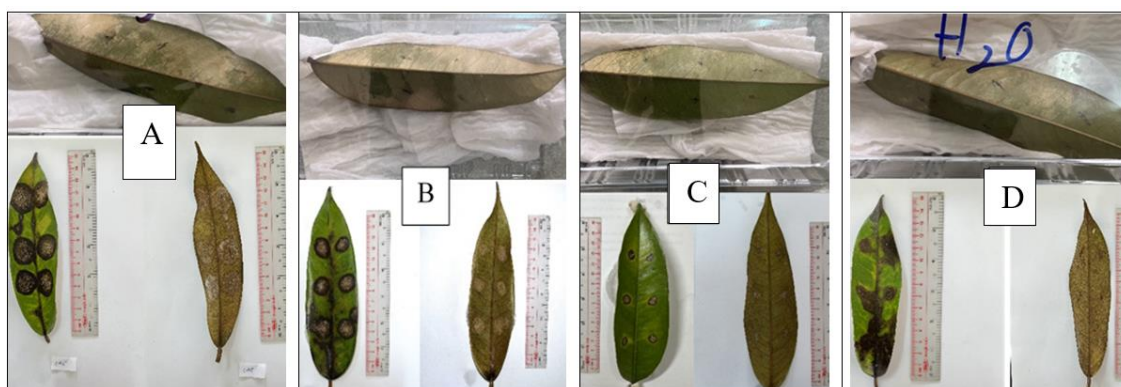
Từ các dạng triệu chứng bệnh thán thư (hình 1, 2 và 3), ba dòng nấm thuộc chi *Colletotrichum* đã được phân lập và xác định. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử của ba dòng nấm này được trình bày tóm tắt trong bảng 2.

Kết quả chủng nhiễm bệnh nhân tạo cho thấy tất cả các dòng nấm *Colletotrichum* phân lập được đều có khả năng xâm nhiễm gây bệnh trên lá sầu riêng ở điều kiện tạo vết thương, với tỉ lệ nhiễm bệnh là 100%. Các triệu chứng bệnh bắt đầu xuất hiện sau 3 ngày chủng

nhiễm. Vết bệnh sau đó dần chuyển sang màu đen. Xung quanh vết bệnh chủng nhiễm *Colletotrichum* sp. 1 và *Colletotrichum* sp. 2 có quầng màu nâu đen, xung quanh vết bệnh chủng nhiễm *Colletotrichum* sp. 5 có quầng màu vàng nhạt. Sau khoảng 7 ngày, bên trên vết bệnh xuất hiện các ổ bào tử màu đen nhỏ li ti. Triệu chứng bệnh trên lá khi chủng nhiễm cũng tương đương với các triệu chứng bệnh ghi nhận được ở điều kiện đồng ruộng (hình 4).

Bảng 3. Kích thước vết bệnh trên của lá sầu riêng theo thời gian lây nhiễm nấm *Colletotrichum* spp.

Dòng nấm	Kích thước vết bệnh theo thời gian (cm)				
	Sau 3 ngày	Sau 4 ngày	Sau 5 ngày	Sau 6 ngày	Sau 7 ngày
<i>Colletotrichum</i> sp.1	0,5 - 1,2	0,6 - 1,9	1,0 - 2,5	1,2 - 2,8	1,4 - 3,0
<i>Colletotrichum</i> sp.2	0,2 - 0,9	0,2 - 1,3	0,5 - 2,5	0,6 - 2,6	0,6 - 2,8
<i>Colletotrichum</i> sp.5	0,2 - 0,5	0,3 - 0,6	0,3 - 1,0	0,3 - 1,2	0,4 - 1,3
Đối chứng	Không có biểu hiện nhiễm bệnh				



Hình 4. Triệu chứng do nấm *Colletotrichum* sp. 1 (A), *Colletotrichum* sp. 2 (B), *Colletotrichum* sp. 5 (C) và nước cất (D) trên lá sầu riêng sau 7 ngày lây nhiễm

Theo khả năng phát triển, gây bệnh của nấm, mức độ gây bệnh của các dòng được đánh giá dựa vào kích thước vết

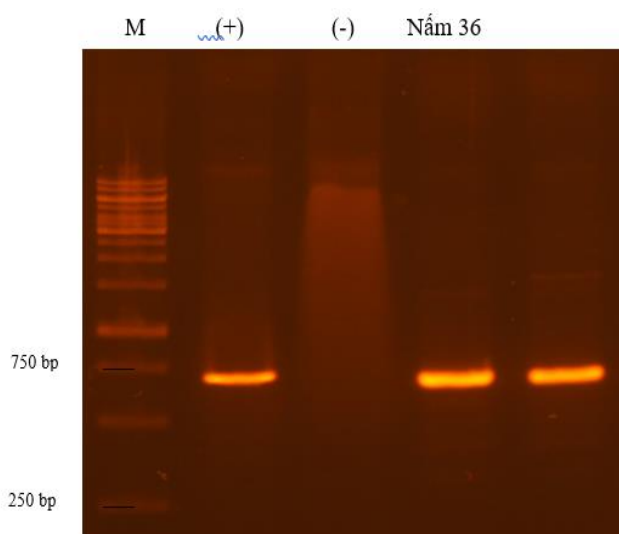
bệnh như sau: *Colletotrichum* sp. 1 và *Colletotrichum* sp. 2 là mạnh nhất, tiếp đó là *Colletotrichum* sp. 5.

3.3. Định danh các dòng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên lá sầu riêng bằng phương pháp sinh học phân tử

Áp dụng quy trình ly trích DNA từ sinh khối của các khuẩn lạc nấm *Colletotrichum* spp. phân lập được, DNA bộ gen của các dòng nấm đều thể hiện hàm lượng DNA sáng rõ và đủ chất lượng

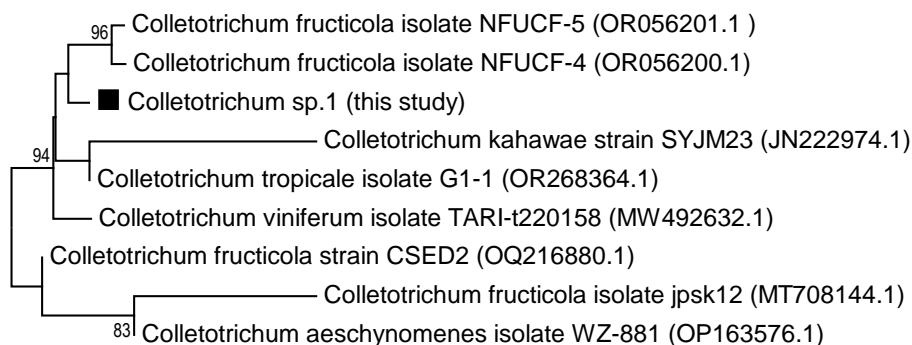
để thực hiện phản ứng PCR. Sau khi thực hiện nhân đoạn gen ITS, DNA của gen ITS được điện di trên gel agarose (hình 5).

Đoạn gen ITS của nấm được tiến hành giải trình tự gen và tra cứu sự tương đồng của chuỗi gen (Blasting) trên GenBank của NCBI. Kết quả tra cứu được biểu hiện bằng cây phả hệ như các hình 5, 6 và 7.

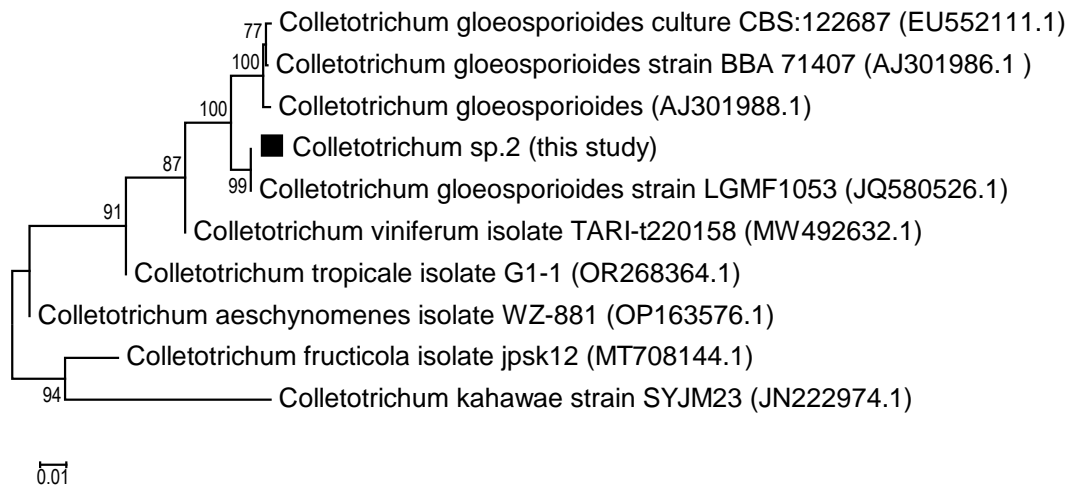


M : Ladder 1Kb
Nấm 36: COL1
+ : mẫu đối chứng dương của phản ứng PCR (DNA nấm Foc TR4)
- : mẫu đối chứng âm của phản ứng PCR không bỏ DNA

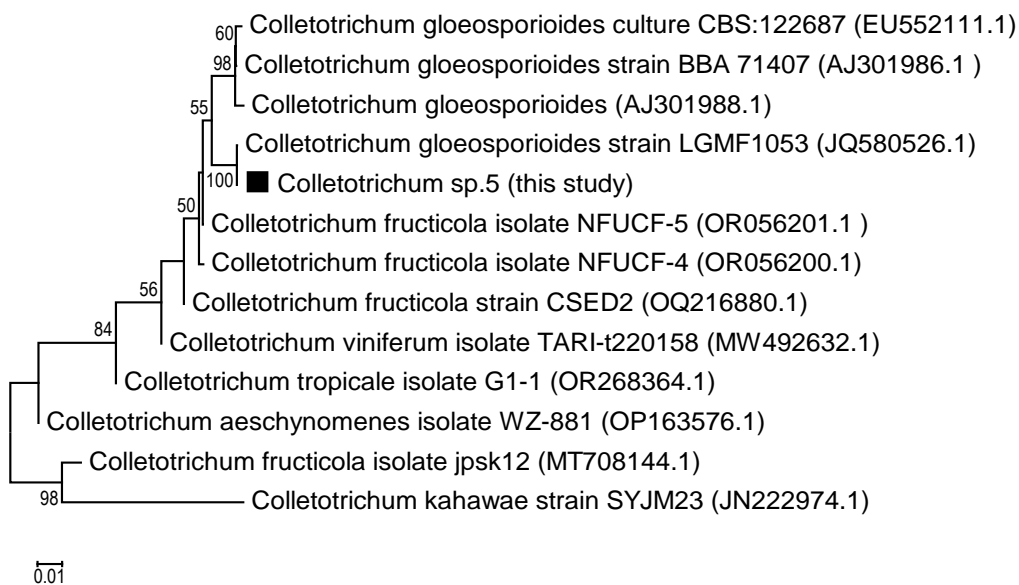
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR của đoạn gen ITS ly trích từ các dòng nấm *Collectotrichum*



Hình 6. Sơ đồ phả hệ của nấm *Colletotrichum* sp. 1



Hình 7. Sơ đồ phả hệ của nấm *Colletotrichum* sp. 2



Hình 8. Sơ đồ phả hệ của nấm *Colletotrichum* sp. 5

Dựa trên kết quả sự tương đồng, 2 loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư hại lá sầu riêng tại Buôn Ma Thuột đã được định danh như sau:

- *Colletotrichum* sp. 1: *Colletotrichum fructicola*.
- *Colletotrichum* sp. 2, *Colletotrichum* sp. 5: *Colletotrichum gloeosporioides*.

C. fructicola là loài nấm có phạm vi phân bố địa lý và ký chủ rộng, đã được ghi nhận gây hại cà phê, ca cao, chè, lê, táo, bơ, xoài, đu đủ, cây có múi,... ở nhiều nơi trên thế giới (Nguyễn Duy Hưng, 2020). Tại Việt Nam, phạm vi ký chủ của *C. fructicola* được công bố cho đến nay khá hẹp, bao gồm: ớt (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2018) và đu đủ (Nguyễn Thị Như

Huỳnh và cs., 2022). Đây là công bố đầu tiên tại Việt Nam về loài nấm này gây bệnh thán thư trên sầu riêng.

C. gloeosporioides là một trong những tác nhân gây bệnh có phạm vi phân bố địa lý và ký chủ rộng nhất trên thế giới, gây hại hơn 470 chi thực vật khác nhau, phân bố khắp các vùng nhiệt đới, ôn đới và á nhiệt đới (Nguyễn Duy Hưng, 2020). Tại Việt Nam, loài nấm này cũng đã được ghi nhận gây hại trên nhiều loại cây trồng, bao gồm: cà phê (Hoàng Văn Thành và cs., 2018), cây có múi, măng cụt, nhãn, chôm chôm (Nguyễn Văn Hòa và cs., 2007), xoài và sầu riêng (Lê Hoàng Lệ Thủy & Phạm Văn Kim, 2008), ớt (Nguyễn Duy Hưng và cs., 2018), măng cầu ta (Đoàn Thị Lan Anh và cs., 2019), hồ tiêu (Nguyễn Anh Dũng và cs., 2020), dâu tây (Nguyễn Kim Nữ Thảo và cs., 2022)...

4. KẾT LUẬN

Ba dòng nấm *Colletotrichum* spp. đã được phân lập từ 3 dạng triệu chứng thán thư điển hình trên lá sầu riêng. Kết quả phân loại hình thái kết hợp với kỹ thuật sinh học phân tử, giải trình tự gen, so sánh và phân tích trình tự DNA trên vùng ITS-rDNA đã xác định được hai loài nấm *Colletotrichum gloeosporioides* và *Colletotrichum fructicola* gây bệnh thán thư hại sầu riêng tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Hải Hằng và Lê Đình Đôn, 2019. "Đặc điểm hình thái, sinh học và phân tử của nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây măng cầu ta (*Annona squamosa* L.) tại tỉnh Bình Thuận và

Tây Ninh", *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, số 2/2019: 25 - 33.

2. Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Văn Bốn, Trần Trung Dũng, Nguyễn Văn Nam, Nguyễn Đình Sỹ, Võ Thị Phương Khanh, Trần Thị Phương Hạnh, Trần Minh Định, Trịnh Thị Huyền Trang, Trần Hồng Hà, Trần Thị Huệ, Nguyễn Thị Huyền, Mai Quốc Quân và Ngô Văn Anh, 2020. *Nghiên cứu ứng dụng các giải pháp công nghệ sinh học tổng hợp để phát triển hồ tiêu bền vững ở Tây Nguyên*, Nxb. Giáo dục Việt Nam, Tp. Hồ Chí Minh.
3. Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Ngọc Anh Thư, Đặng Thùy Linh và Nguyễn Huy Cường, 2007. *Sổ tay phòng trừ một số bệnh hại quan trọng trên cây ăn quả đặc sản tỉnh Bến Tre*, Nxb. Phương Đông, Tp. Hồ Chí Minh.
4. Nguyễn Thị Như Huỳnh, Quách Văn Cao Thi, Nguyễn Trung Trục và Trần Quốc Dũng, 2022. "Phân lập vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên trái đu đủ sau thu hoạch", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, số 228(1): 357 - 363.
5. Nguyễn Duy Hưng, 2020. *Nghiên cứu thành phần loài, tính gây bệnh và khả năng phòng chống nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư ớt tại đồng bằng Sông Hồng*, Luận án Tiến sĩ ngành Bảo vệ thực vật, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
6. Nguyễn Duy Hưng, Hà Viết Cường và Hoàng Chúng Lâm, 2018. "Phát hiện các loài *Colletotrichum* gây bệnh thán thư ớt bằng phản ứng chuỗi polymerase", *Vietnam J. Agri. Sci.*, Số 16(12): 1025 - 1038.
7. Hoàng Văn Thành, Nguyễn Văn Tuất, Trịnh Xuân Hoạt và Lê Thị Thảo, 2018. "Một số đặc điểm sinh học của nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cà phê chè tại Sơn La và hiệu lực của một số thuốc ức chế sự phát triển của nấm trên môi trường nhân tạo", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 8(93): 74 - 81.
8. Nguyễn Kim Nữ Thảo, Đinh Thị Ngọc Mai, Võ Hoài Hiếu, Lê Thị Hương, Phạm Thị Huệ,

- Ninh Thị Hạnh, Lê Vinh Hoa, Phạm Văn Quân và Nguyễn Hồng Minh, 2022. "Chọn lọc và nhận diện vi khuẩn đối kháng nấm bệnh gây hư hỏng quả dâu tây sau thu hoạch", *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm - tập 5, số 1, 2022, số 5(1): 25 - 36.*
9. Lê Hoàng Lê Thủy và Phạm Văn Kim, 2008. "Phân loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên xoài và sầu riêng tại đồng bằng Sông Cửu Long và thử hiệu lực của sáu loại thuốc đối với các loài nấm này", *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, số 10: 31 - 40.
10. Mai Văn Trị, 2002. *Một số bệnh hại trên cây ăn trái. Sổ tay người nông dân trồng cây ăn trái cần biết*, Công ty Dịch vụ Bảo vệ thực vật An Giang.
11. Barnett, H. L. và Hunter, B. B., 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, APS Press, St. Paul.
12. Cannon, P., Damm, U., Johnston, P. và Weir, B., 2012. "*Colletotrichum* current status and future directions", *Studies in Mycology*, Vol. 73: 181 - 213.
13. Liu, F., Ma, Z., Hou, L., Diao, Y., Wu, W., Damm, U., Song, S. và Cai, L., 2022. "Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview", *Stud Mycol.*, Vol. 101: 1 - 56.
14. Sutton, B., 1980. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*, Commonwealth Mycological Institute, UK.

ABSTRACT

Composition of *Colletotrichum* species causing anthracnose disease on durian in Buon Ma Thuot city, Dak Lak province

Durio (Durio zibethinus Murray), the "king of fruits", is expanding rapidly in Dak Lak province. This is one of the favorable conditions for various pests and diseases attacking durian trees, including anthracnose disease caused by Colletotrichum spp. The objective of this study is to determine the diversity of Colletotrichum species causing durian anthracnose disease. Research result shows that anthracnose symptoms on durian leaves are quite diverse, with 3 different typical symptoms. Two species of Colletotrichum causing anthracnose disease on durian leaves in Buon Ma Thuot city, Dak Lak province were identified, namely: Colletotrichum fructicola and Colletotrichum gloeosporioides. Among them, Colletotrichum fructicola was first recorded on durian in Vietnam.

Keywords: anthracnose, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides* durian.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÝ SINH TRÙNG TUYẾN TRÙNG *Meloidogyne incognita* CỦA MỘT SỐ DÒNG VI SINH VẬT PHÂN LẬP TẠI TÂY NGUYÊN

Nguyễn Văn Nam^{1*}, Đỗ Thị Kiều An¹,
Đào Thị Lan Hoa², Nguyễn Văn Bốn¹

¹Trường Đại học Tây Nguyên

²Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên
E-mail liên hệ: nvnam@ttn.edu.vn

TÓM TẮT

Tuyến trùng ký sinh thực vật *Meloidogyne* và nấm bệnh *Phytophthora*, *Fusarium* gây thiệt hại kinh tế đáng kể trên một số cây trồng quan trọng vùng Tây Nguyên. Một số vi sinh vật được phân lập và đánh giá có khả năng ký sinh tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. Các vi sinh vật này có tiềm năng phát triển chế phẩm sinh học và ứng dụng trong quản lý tuyến trùng an toàn với môi trường. Nấm *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Metarhizium* ký sinh trùng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* và một số dòng vi khuẩn, xạ khuẩn có khả năng đối kháng tuyến trùng *Meloidogyne incognita*.

Từ khóa: Đối kháng, ký sinh, *Meloidogyne*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, vi khuẩn, xạ khuẩn.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Có nhiều loài tuyến trùng gây hại trên cây trồng quan trọng tại các tỉnh Tây Nguyên: *Pratylenchus coffeae*, *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* sp., *Tylenchus* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Xiphinema* sp. và *Aphelenchus* sp.... Trong đó, *Meloidogyne* là chi phổ biến nhất. Tuyến trùng kết hợp một số nấm trong đất như *Phytophthora*, *Fusarium*... gây hại nghiêm trọng hơn và khó phòng trừ hơn (2).

Nhiều vi sinh vật tồn tại trong môi trường đất có khả năng ký sinh tuyến trùng và phân bố rộng ở nhiều vùng sinh

thái và điều kiện khí hậu khác nhau. Hiệu quả đối kháng các vi sinh vật này bị tác động bởi nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học. Các vi sinh vật đối kháng này tác dụng chậm so với hóa chất và thường phải kết hợp với các biện pháp kỹ thuật khác và có hiệu quả lâu dài (1, 3, 4, 5, 6, 10).

Trichoderma, *Paecilomyces*, *Metarhizium* là một trong những chi nấm được ghi nhận có nhiều chức năng có lợi: đối kháng nấm gây bệnh, ký sinh tuyến trùng, phân giải chất hữu cơ (7, 8, 9). *Trichoderma* được sử dụng như một vi sinh vật đối kháng chống lại các loại nấm gây bệnh trên cây trồng. Vi khuẩn và xạ khuẩn được ghi nhận ký sinh trên tuyến trùng, một số chế phẩm sinh học được phát triển và có

Người phân biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Minh

hiệu quả trong phòng trừ tuyến trùng. Trong nghiên cứu này trình bày một số kết quả đánh giá một số dòng vi sinh vật ký sinh trên tuyến trùng *Meloidogyne incognita* tại Tây Nguyên.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn được phân lập tại Tây Nguyên và lưu giữ tại Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên. Hóa chất và dụng cụ tại Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Tây Nguyên. Trứng tuyến trùng *Meloidogyne* được ly trích từ rễ cây dưa leo.

2.2. Chuẩn bị dịch tuyến trùng

Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* được thu thập từ rễ các cây hồ tiêu bị bệnh và nhân nuôi trên rễ cây dưa leo trồng trong nhà lưới. Rửa sạch đất bám xung quanh rễ. Dùng dao mổ hoặc panh để thu thập khối trứng tuyến trùng từ các u sưng trên rễ. Rửa trứng tuyến trùng bằng nước cất vô trùng rồi bằng dung dịch sodium hypoclorit 0,5%, khuấy và rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi thu trứng bằng rây có kích thước lỗ rây 26 μm . Tuyến trùng được ly trích theo phương pháp phễu Baermann có cải tiến để thu tuyến trùng tuổi 2 (IJ2). Tuyến trùng được xử lý tiệt trùng bằng dung dịch Streptomycin sulphate (2000 ppm) để tránh nhiễm khuẩn.

2.3. Xác định khả năng đối kháng trứng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm

Đánh giá theo phương pháp ký sinh trực tiếp trên đĩa thạch, mức độ đối kháng được phân thành 4 cấp: ký sinh cao (+++):

tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh trên 80%; ký sinh trung bình (++) : tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh từ 50 - 80%; ký sinh yếu (+): tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh dưới 50%; không ký sinh (-): tỷ lệ trứng tuyến trùng bị ký sinh 0%.

2.4. Phương pháp đánh giá khả năng tiêu diệt tuyến trùng *Meloidogyne* của các chủng vi khuẩn, xạ khuẩn

Hút 0,5 ml dịch lọc nuôi cấy vi khuẩn, xạ khuẩn đã chuẩn bị ở trên vào các ống nghiệm đã tiệt trùng. Thêm dung dịch chứa khoảng 100 cá thể *Meloidogyne incognita* tuổi hai mới nở vào mỗi giếng, để ở điều kiện nhiệt độ phòng. Đối chứng là tuyến trùng trong môi trường nuôi vi khuẩn và xạ khuẩn tiệt trùng. Chỉ tiêu theo dõi: số lượng tuyến trùng chết và tỉ lệ tử vong sau 6, 12 và 24 giờ ủ. Tuyến trùng được coi là chết nếu chúng không di chuyển khi thăm dò chúng bằng đầu kim nhỏ. Khả năng tiêu diệt tuyến trùng của vi khuẩn, xạ khuẩn được xác định bằng công thức tỉ lệ của tuyến trùng chết chia số tuyến trùng thí nghiệm.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu sau khi ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích ANOVA và kiểm định khác biệt bằng phương pháp Duncan với phần mềm SAS.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Các mẫu nấm của 6 chi *Metarhizium*, *Beauveria*, *Peacilomyces*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Cordyceps* được lựa chọn và sử dụng để đánh giá khả năng diệt tuyến trùng. Số lượng các mẫu phân lập và tỷ lệ

số mẫu phân lập có khả năng ký sinh được trình bày bảng 1.

20 mẫu phân lập nấm chiếm 17,7% thuộc 5 chi có tỉ lệ ký sinh trùng tuyến trùng trên 80%. Trong đó chi *Trichoderma* có 7 mẫu phân lập, *Metarhizium* có 5 mẫu phân lập, *Beauveria* có 2 mẫu phân lập, *Peacilomyces* có 5 mẫu phân lập và

Verticillium có 1 mẫu phân lập. Các mẫu phân lập thuộc 2 chi *Metarhizium*, *Beauveria* khá quan trọng và phổ biến được ghi nhận là nấm ký sinh côn trùng, trong nghiên cứu này các nấm này được ghi nhận ký sinh trùng tuyến trùng trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Bảng 1. Số lượng và tỉ lệ mẫu nấm có khả năng ký sinh tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80%

STT	Chi nấm	SLSL	SLKS trên 80%				Tỉ lệ (%)
			Đợt 1	Đợt 2	Bổ sung	Tổng	
1	<i>Trichoderma</i>	44	4	3	0	7	15,9
2	<i>Metarhizium</i>	33	2	3	0	5	15,1
3	<i>Beauveria</i>	12	1	1	0	2	16,7
4	<i>Peacilomyces</i>	16	2	1	2	5	31,3
5	<i>Verticillium</i>	3	0	1	0	1	33,3
6	<i>Cordyceps</i>	5	0	0	0	0	0
Tổng số		113	9	9	2	20	17,7

Ghi chú: SLSL số lượng sàng lọc, SLKS: số lượng ký sinh.

Trong số 44 mẫu nấm *Trichoderma* phân lập được có 10 mẫu có khả năng ký sinh trùng tuyến trùng *Meloidogyne incognita*; trong đó, 7 mẫu phân lập có mức độ ký sinh trùng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80%. Đây là

cơ hội để phát triển chế phẩm sinh học. *Trichoderma* là nấm dễ nuôi cấy và phát triển chế phẩm. Nấm này còn có nhiều chức năng khác như đối kháng nấm gây bệnh, phân hủy tàn dư thực vật, dùng làm phân hữu cơ...

Bảng 2. Khả năng ký sinh trùng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80% của các mẫu phân lập nấm *Trichoderma*

STT	Ký hiệu	Tỉ lệ ký sinh (%)			Khả năng kí sinh	Kiểu kí sinh
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3		
1	T1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
2	T2	18,5 ± 2,67	31,1 ± 2,57	81,5 ± 1,33	+++	Tan
3	T3	45,4 ± 3,41	80,83 ± 2,54	92,5 ± 2,60	+++	Xâm nhập, tạo búi
4	T4	37,0 ± 2,89	48,67 ± 1,76	82,0 ± 3,46	+++	Xâm nhập, tan
5	T5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
6	T6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
7	T7	13,7 ± 2,89	23,70 ± 0,98	22,2 ± 1,28	+	Tan
8	T8	56,7 ± 2,53	66,67 ± 1,10	85,0 ± 2,60	+++	Tan

STT	Ký hiệu	Tỉ lệ ký sinh (%)			Khả năng ký sinh	Kiểu ký sinh
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3		
9	T9	20,7 ± 1,60	31,85 ± 3,23	38,9 ± 2,80	+	Tan
10	T10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
11	T11	46,3 ± 2,60	74,17 ± 0,42	85,4 ± 1,10	+++	Xâm nhập, tạo búi
12	T12	37,4 ± 2,25	48,52 ± 3,03	82,0 ± 2,67	+++	Xâm nhập, tạo búi
13	T13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
14	T14	30,0 ± 4,02	32,50 ± 3,31	40,0 ± 1,44	+	Tạo búi, tan
15	T15	36,9 ± 3,98	71,50 ± 0,72	84,3 ± 3,15	+++	Xâm nhập, tạo búi
16	T16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
17	T17 - T44	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-

Ghi chú: +++: tỷ lệ tuyến trùng, trứng tuyến trùng bị ký sinh > 80%; ++: tỷ lệ tuyến trùng, trứng tuyến trùng bị ký sinh từ 50 - 80%; +: tỷ lệ tuyến trùng, trứng tuyến trùng bị ký sinh < 50%; -: không ký sinh.

Bảng 3. Khả năng ký sinh trứng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80% của các mẫu phân lập nấm thuộc chi *Metarhizium*

STT	Ký hiệu mẫu phân lập	Tỉ lệ ký sinh (%)			Khả năng ký sinh	Kiểu ký sinh
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3		
1	M1	38,0 ± 2,31	59,0 ± 1,53	68,0 ± 1,16	++	Tan
2	M2	57,5 ± 1,44	63,33 ± 4,10	81,3 ± 2,17	+++	Ổ bào tử
3	M3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
4	M4	8,52 ± 0,98	14,81 ± 0,98	21,9 ± 0,98	+	Tan
5	M5	53,7 ± 2,53	76,67 ± 1,10	86,0 ± 1,60	+++	Tan
6	M6	27,0 ± 2,89	38,67 ± 1,76	58,0 ± 3,46	++	Tan
7	M7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
8	M8	43,0 ± 2,19	58,67 ± 1,76	85,0 ± 3,12	+++	Tan
9	M9	56,0 ± 2,89	61,67 ± 1,76	84,0 ± 3,02	+++	Tan
10	M10	49,0 ± 3,89	68,67 ± 1,76	85,0 ± 2,46	+++	Tan
11	M11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-
12	M12 - M24	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-

Ghi chú: +++: tỷ lệ tuyến trùng, trứng tuyến trùng bị ký sinh > 80%; ++: tỷ lệ tuyến trùng, trứng tuyến trùng bị ký sinh từ 50 - 80%; +: tỷ lệ tuyến trùng, trứng tuyến trùng bị ký sinh < 50%; -: không ký sinh.

Metarhizium là nấm ký sinh côn trùng được nghiên cứu từ lâu và phát triển thành nhiều chế phẩm thương mại. Trong nghiên cứu này, nấm này cũng ghi nhận có khả năng ký sinh tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80%. Kết quả nghiên cứu

đánh giá cho thấy có 5 mẫu phân lập nấm *Metarhizium* có khả năng ký sinh trứng tuyến trùng trên 80%. Hình thức ký sinh tuyến trùng của nấm này là làm tan toàn bộ trứng và hình thành các khối bào tử dày (hình 1).

Bảng 5. Tỷ lệ chết của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* khi xử lý với các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Thời gian theo dõi		
	6 giờ	12 giờ	24 giờ
K1	8,69 ^d	13,89 ^g	36,81 ^d
K2	29,62 ^a	72,09 ^a	85,59 ^{ab}
K3	9,58 ^d	27,09 ^f	62,04 ^c
K4	28,20 ^a	35,66 ^d	71,73 ^{bc}
K5	9,64 ^d	30,17 ^{ef}	72,44 ^{bc}
K6	22,74 ^b	66,03 ^b	92,28 ^a
K7	6,60 ^{de}	14,04 ^g	30,73 ^d
K8	20,79 ^b	33,09 ^{de}	61,41 ^c
K9	15,32 ^c	41,56 ^c	70,60 ^{bc}
Nước	4,60 ^e	8,99 ^g	29,25 ^d
CV (%)	10,11	6,88	13,66

Ghi chú: các ký tự giống nhau theo hàng dọc thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $\alpha = 0,05$.

Kết quả cho thấy, ở thời điểm 6 giờ theo dõi thì tỉ lệ tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80% chết dao động từ 6,60% đến 29,62% và hiệu quả tiêu diệt tuyến trùng cao nhất là chủng vi khuẩn K2 với 29,62%. Sang đến thời điểm theo dõi 12 giờ thì hiệu quả tiêu diệt tuyến trùng

tuổi hai tăng lên ở tất cả các chủng vi khuẩn. Hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne incognita* cao nhất ở chủng K2 với 72,09%. Đến thời điểm 24 giờ theo dõi thì hiệu quả tiêu diệt tuyến trùng của 5 mẫu phân lập trên 70%.

Bảng 6. Kết quả khả năng kháng tuyến trùng các chủng xạ khuẩn

Đá Lắc		Gia Lai		Đá Nông	
Ký hiệu	Tỉ lệ chết (%)	Ký hiệu	Tỉ lệ chết (%)	Ký hiệu dòng	Tỉ lệ chết (%)
LXK1	13,38 ± 0,17 ^h	GXK1	33,33 ^b	NXK 1	45,00 ^{bc}
LXK2	50,10 ± 0,07 ^c	GXK2	40,00 ^b	NXK 2	41,67 ^{bc}
LXK3	75,07 ± 0,03^a	GXK3	86,67^a	NXK 3	53,33 ^c
LXK4	25,31 ± 0,07 ^e	GXK4	33,33 ^b	NXK 4	36,67 ^b
LXK5	56,07 ± 0,05 ^b	GXK5	35,00 ^b		
LXK6	23,30 ± 0,03 ^f	GXK6	33,33 ^b		
LXK7	16,29 ± 0,06 ^g	GXK7	33,33 ^b		
LXK8	35,07 ± 0,04 ^d	GXK8	25,00 ^b		

Ghi chú: LXK: loài xạ khuẩn.

Biểu hiện tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80% chết giống như biểu hiện khi xử lý với vi khuẩn, có hai mẫu phân lập xạ khuẩn *Sreptomycetes* có tỉ lệ chết trên 70% là LXX3 và GXX3.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Phát hiện 20 mẫu phân lập nấm chiếm 17,7% thuộc 5 chi có tỷ lệ ký sinh trùng tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên 80% trên 80% và có 5 mẫu phân lập vi khuẩn và 02 mẫu xạ khuẩn có hiệu quả tiêu diệt tuyến trùng *Meloidogyne incognita* ở giai đoạn tuổi hai cao trên 70%.

4.2. Đề nghị

Định danh sinh học phân tử các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng và ký sinh cao, đồng thời nghiên cứu các điều kiện thích hợp để phát triển chế phẩm sinh học từ các chủng vi sinh vật tiềm năng nhằm ứng dụng trong quản lý tuyến trùng theo hướng thân thiện với môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M, 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2: 43 - 56.
2. Gary J. Samuel, 2004. *Trichoderma a guide to identification and biology*.
3. Marco JLD, Lima LHC, Sousa MV, Felix CR, 2000. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. *World Journ of Microbiol and Biotechnol* 16: 383 - 386.
4. Nguyen VN, Kim YJ, Oh KT, Jung WJ, Park RD, 2007. The role of chitinase from *Lecanicillium antillanum* B-3 in parasitism to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs. *Biocont Scien and Technol* 10: 1047 - 1058.
5. Nguyen VN, Kim YJ, Oh KT, Jung WJ, Park RD, 2008. The antifungal activity of chitinases from *Trichoderma aureoviride* DY-59 and *Rhizopus microsporus* VS-9. *Curr Microbiol* 56: 28 - 32.
6. Nguyen VN, In-Jae Oh, Young-Ju Kim, Kil-Yong Kim, Young-Cheol Kim, Ro-Dong Park, 2009. Purification and characterization of chitinases from *Meloidogyne incognita* egg-parasitic fungus *Paecilomyces variotii* DG-3. *Journ of Industrl Microbiol and Biotechnol*. 36:195 - 203.
7. Nguyễn Văn Nam, 2009. Cơ chế thủy phân của enzym Chi32 và Chi46 tinh sạch từ nấm *Paecilomyces variotii* lên chitin cấu thành trong sợi nấm *Fusarium solani*. *Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực vật Việt Nam*. Nxb. Nông nghiệp.
8. Nguyễn Văn Nam, 2009. Vai trò của enzym Chi32 và Chi46 tinh sạch từ nấm *Paecilomyces variotii* trong quá trình ký sinh trùng tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. *Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc Khu vực phía Nam*. Nxb. Khoa học Kỹ thuật.
9. Nguyễn Văn Nam và ctv., 2010. Chức năng chitinase của nấm *Trichoderma harzianum* T1 trong quá trình đối kháng với nấm gây bệnh *Fusarium solani*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*.
10. Seidl V. Huemer B. Seiboth B. Kubicek C.P., 2005. A complete survey of *Trichoderma chitinases* reveals three distinct subgroups of family 18. *FEBS J*: 272:5923 - 5939.
11. Van Bon Nguyen, San-Lang Wang, Thi Hanh Nguyen, Thi Huyen Nguyen, Thi Huyen Trang Trinh, Thi Thiep Nong, To Uyen Nguyen, Van Nam Nguyen, Anh Dzung Nguyen, 2019. Reclamation of rhizobacteria newly isolated from black pepper plant roots as potential biocontrol agents of root-knot nematodes. *Research on Chemical Intermediates* 45, pages 5293 - 5307.

ABSTRACT

Assessment the parasitism of some of microorganisms isolated in the central highland on *Meloidogyne incognita* EGG

Plant parasitic nematode Meloidogyne and soil-borne fungal pathogens Phytophthora and Fusarium have been causing significant economic losses on many cash crops in the Central Highlands of Vietnam. Some isolated microorganisms showed their parasitism to Meloidogyne incognita. These microorganisms have potentials to develop bio-formulations and apply in environmental friendly nematode management. Trichoderma, Paecilomyces and Metarhizium parasitize root-knot nematode Meloidogyne incognita eggs. In addition, some bacteria and actinomycetes strains showed their role in antagonism to Meloidogyne incognita.

Keywords: *actinomycetes, antagonism, bacteria, Meloidogyne, Metarhizium, Paecilomyces, parasite, Trichoderma.*

SỬ DỤNG DỊCH CHIẾT TỎI PHÒNG TRỪ BỆNH THÁN THƯ (*Colletotrichum* spp.) HẠI ỚT CAY

Võ Thị Dung¹, Hà Minh Thanh²,
Vũ Triệu Mân³, Nguyễn Hoàng Tiến¹

¹ Trường Đại học Kinh tế Nghệ An

² Viện Bảo vệ thực vật

³ Hội Nghiên cứu Bệnh hại thực vật Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu dịch chiết tỏi đến khả năng phòng trừ bệnh thán thư (*Colletotrichum* spp.) hại ớt cay cho thấy nồng độ từ 2 - 5% sau 12 giờ, 24 và 48 giờ hiệu lực ức chế đối với sự nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. đạt 100%, nồng độ 1% sau 48 giờ hiệu lực ức chế đạt 87,12%. Trong điều kiện nhà lưới phun dịch chiết tỏi với nồng độ 3%, 4%, 5% lên cây ớt cay sau 24 giờ lây bệnh hiệu lực ức chế tính gây bệnh của *Colletotrichum* spp. khi cây được 5 tuần tuổi đạt 58,29 - 73,57%, cây có quả với chiều dài quả 1 - 2 cm đạt 45,51 - 68,15%. Trên đồng ruộng khi cây ớt được 5 tuần và cây có chiều dài quả 1 - 2 cm, sử dụng dịch chiết tỏi với nồng độ 4% đối với bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. HLPT đạt 62,52% và 57,39%.

Từ khóa: tỏi, bệnh thán thư, *Colletotrichum* spp.

1. MỞ ĐẦU

Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. trên cây ớt được xem là nguy hiểm nhất (Than và cs., 2008). Ở bang Ohio, Mỹ bệnh thán thư đã làm giảm gần 100% năng suất của cây ớt, tại Thái Lan, Ấn Độ, Hàn Quốc, bệnh làm giảm từ 10 - 80% năng suất. Ở Việt Nam, bệnh thán thư xuất hiện và gây hại hầu hết ở các tỉnh có trồng ớt tập trung như Nghệ An, Thanh Hóa, Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Hưng Yên, Thái Bình, Hải Dương.

Ngày nay, việc quản lý bệnh thán thư hại ớt trong sản xuất chủ yếu được thực

hiện bằng thuốc hóa học, gây ô nhiễm môi trường, sản phẩm chưa đảm bảo an toàn đối với người tiêu dùng. Vì vậy, quản lý bệnh hại chọn hướng phòng trừ bệnh hiệu quả, an toàn cho người tiêu dùng, thân thiện với môi trường là vấn đề cần thiết. Mặt khác trong giai đoạn hiện nay, hầu hết các sản phẩm nông nghiệp đều được quan tâm đến vấn đề an toàn thực phẩm cho người sử dụng. Việc sử dụng các dịch chiết có nguồn gốc từ thực vật để phòng chống bệnh hại cây trồng là vấn đề cần thiết và cần được thực hiện trong sản xuất nông nghiệp an toàn.

Tỏi (*Allium sativum*) là cây gia vị rất phổ biến trên các vùng miền ở Việt Nam.

Người phân biện: TS. Lê Mai Nhật

Đã có một số nghiên cứu về việc sử dụng dịch tỏi để phòng chống các loài sinh vật hại trên cây trồng. Các chất chính trong củ tỏi là tinh dầu, với các sulfur và polysulfur de vinyle; các chất kháng khuẩn: allycin, allycetin I và II, men allynin và acid nicotinic. Alliicin là hoạt chất có tác dụng nhiều nhất đối với các nấm gây bệnh trên cây trồng. Kết quả nghiên cứu dịch chiết từ thân, rễ, lá, củ của cây tỏi có thể hạn chế sự phát của nấm gây bệnh thán thư trên cây ớt khi phun chúng ở giai đoạn bệnh mới xuất hiện (Alves và cs., 2015), (Rashid và cs., 2015). Bài báo này cung cấp dẫn liệu khoa học về sử dụng dịch chiết tỏi làm ức chế nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư ớt.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống ớt cay sừng (*Capsium frutescens* L).
- Tỏi củ (*Allium sativum* L).
- Nguồn nấm *Colletotrichum* spp. phân lập từ triệu chứng bệnh thán thư cây ớt tại các vùng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo dịch chiết tỏi

Sử dụng tỏi củ để tạo dịch chiết: cân 50 g tỏi củ sau khi được rửa sạch, bóc vỏ, làm khô tự nhiên trong phòng thí nghiệm, tỏi được giã nhỏ cho vào 200 ml nước cất, đun sôi trong thời gian 30 phút lọc lấy dịch sau đó tiếp tục đun sôi để thu được 50 ml dịch. Dịch chiết tỏi được xem là nguyên chất, được pha loãng ở các nồng độ khác nhau và sử dụng trong các thí nghiệm.

2.2.2. Trong điều kiện invitro

* Trên môi trường WA

- Môi trường WA sau khi được hấp khử trùng trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 121°C (1,5 atm), để môi trường (45 - 50°C) và đặt trong buồng nuôi cấy vi sinh vật.

- Lấy lượng dịch chiết của Tỏi tương ứng với 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml cho vào các bình tam giác có chứa 100 ml môi trường WA để được nồng độ 1 đến 5%.

Lắc đều mỗi bình để dịch chiết tỏi tan đều trong môi trường WA, sau đó đổ môi trường có chứa dịch chiết ra đĩa petri.

Sử dụng phương pháp cấy đơn bào tử lên bề mặt đĩa petri có chứa dịch chiết ở các nồng độ khác nhau, cấy 30 bào tử nấm *Colletotrichum* spp. vào mỗi đĩa petri. Các đĩa petri sau khi cấy được để trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28°C với điều kiện sáng - tối xen kẽ. Công thức đối chứng là công thức chỉ cấy nấm nhưng không sử dụng dịch chiết.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 6 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, 3 đĩa petri/lần nhắc, quan sát 30 bào tử/đĩa.

Công thức 1 (đối chứng): nước cất vô trùng.

Công thức 2 - 5: dịch chiết tỏi có nồng độ tương ứng 1%; 2%; 3%; 4%; 5%.

Chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ bào tử nảy mầm (%), hiệu lực ức chế (%) sau 12; 24 và 48 giờ nuôi cấy.

* Trên cây ớt

Trồng cây ớt cay sừng trên nền đất và xơ dừa sau khi được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 2 giờ được trộn đều với

phân vi sinh, khi cây có quả tiến hành phun dịch chiết tỏi 1 - 5% lên lá và quả:

- Phun dung dịch tỏi với nồng độ từ 1 đến 5%, lên lá và quả. Sau 24 giờ tiến hành lây bệnh nhân tạo nấm *Colletotrichum* spp. với nồng độ 10^5 bào tử/ml lên lá, quả.

- Lây bệnh nhân tạo trên lá và quả, nồng độ 10^5 bào tử/ml. Sau 24 giờ, phun dung dịch tỏi ở các nồng độ từ 1 đến 5%. Lá và quả được lây bệnh nhân tạo nhưng không xử lý dịch chiết là công thức đối chứng.

Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 11 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc 3 cây.

Công thức 1: phun dung dịch tỏi (nồng độ 1%) + lây bệnh

Công thức 2: phun dung dịch tỏi (nồng độ 2%) + lây bệnh

Công thức 3: phun dung dịch tỏi (nồng độ 3%) + lây bệnh

Công thức 4: phun dung dịch tỏi (nồng độ 4%) + lây bệnh

Công thức 5: phun dung dịch tỏi (nồng độ 5%) + lây bệnh

Công thức 6: lây bệnh + phun dung dịch tỏi (nồng độ 1%)

Công thức 7: lây bệnh + phun dung dịch tỏi (nồng độ 2%)

Công thức 8: lây bệnh + phun dung dịch tỏi (nồng độ 3%)

Công thức 9: lây bệnh + phun dung dịch tỏi (nồng độ 4%)

Công thức 10: lây bệnh + phun dung dịch tỏi (nồng độ 5%)

Công thức 11 (Đ/C): lây bệnh + phun nước cất vô trùng

Chỉ tiêu theo dõi: thời gian ủ bệnh (ngày), đường kính vết bệnh (mm) trên lá, quả.

2.2.3. Trong điều kiện nhà lưới

Trồng ớt cay sừng trong nhà lưới và chăm sóc cây, sau 5 tuần và khi cây có quả với chiều dài quả từ 1 - 2 cm phun dịch chiết tỏi, sau 24 giờ tiến hành lây bệnh. Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 3 cây.

Công thức 1: phun dung dịch tỏi (nồng độ 3%) + lây bệnh nhân tạo

Công thức 2: phun dung dịch tỏi (nồng độ 4%) + lây bệnh nhân tạo

Công thức 3: phun dung dịch tỏi (nồng độ 5%) + lây bệnh nhân tạo

Công thức 4: phun nước lã.

Chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ bệnh (%), chỉ số bệnh (%).

2.2.4. Thí nghiệm diện hẹp

Thí nghiệm bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn, gồm 4 công thức, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, diện tích ô thí nghiệm là 5 m^2

Công thức 1: phun dung dịch tỏi (nồng độ 4%) sau trồng 5 tuần

Công thức 2: phun dung dịch tỏi (nồng độ 4%) khi cây có quả từ 1 - 2 cm

Công thức 3: phun dung dịch tỏi (nồng độ 4%) sau thu hoạch quả lần đầu

Công thức 4: phun nước lã

Chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ bệnh (%), chỉ số bệnh (%).

2.3. Phương pháp tính toán số liệu

Hiệu lực của dịch chiết sử dụng công thức Abbott:

$$\text{HLPT} (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó:

- HLPT (%): hiệu lực phòng trừ

- C: CSB(%) ở các công thức đối chứng

- T: CSB(%) ở các công thức thí nghiệm

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của dịch chiết tỏi đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. trong điều kiện *in vitro*

Đánh giá khả năng ức chế nảy mầm của bào tử *Colletotrichum* spp. thí nghiệm

dịch chiết tỏi ở nồng độ 1%, 2%, 3%, 4% và 5% trong điều kiện *in vitro*. Đơn bào tử nấm *Colletotrichum* spp. được cấy lên đĩa petri môi trường WA trong điều kiện nhiệt độ 28°C, sáng - tối xen kẽ, sau 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ theo dõi tỉ lệ nảy mầm của bào tử nấm (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết tỏi đến khả năng nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp.

Công thức	Nồng độ (%)	Tỉ lệ bào tử nảy mầm (%)			Hiệu lực ức chế (%)		
		12 giờ	24 giờ	48 giờ	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1 (ĐC)		100	100	100	-	-	-
CT2	1	0	0	10,88	100	100	87,12 ^b
CT3	2	0	0	0	100	100	100 ^a
CT4	3	0	0	0	100	100	100 ^a
CT5	4	0	0	0	100	100	100 ^a
CT6	5	0	0	0	100	100	100 ^a
<i>LSD</i> _{0,05}							5,49

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 12 giờ và 24 giờ hiệu lực ức chế của dịch chiết tỏi ở các nồng độ khác nhau đối với bào tử nấm *Colletotrichum* spp. đạt 100%, sau 48 giờ hiệu lực ức chế của dịch chiết tỏi ở nồng độ từ 2 đến 5% hiệu lực ức chế đạt 100% còn dịch chiết tỏi ở nồng độ 1% đạt 87,12% (bảng 1). Như vậy sau 24 giờ và sau 48 giờ dịch chiết tỏi ở nồng độ 3%, 4% và 5% có hiệu lực ức chế đối với nấm *Colletotrichum* spp. đạt 100%.

3.2. Ảnh hưởng của dịch chiết tỏi đến khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên giống ớt cay sừng trong điều kiện *in vitro*

Thí nghiệm tiến hành trong điều kiện *in vitro* về khả năng ức chế của

dịch chiết tỏi đến tính gây bệnh của nấm *Colletotrichum* spp. trên ớt cay sừng.

Khi xử lý dịch chiết tỏi thời gian ủ bệnh trên lá và quả tỉ lệ thuận với chiều tăng của nồng độ, thời gian ủ bệnh trên quả ngắn hơn so với thời gian ủ bệnh trên lá, thời gian ủ bệnh ở các công thức dao động từ 6,51 - 7,59 ngày (trên lá) và 5,08 - 5,91,6 ngày (trên quả). Sau lây bệnh 24 giờ thời gian ủ bệnh giữa các công thức chưa sai khác ở mức có ý nghĩa thống kê nhưng trước lây bệnh 24 giờ thời gian ủ bệnh trên lá và quả có sự sai khác giữa các công thức so với công thức đối chứng. Đường kính vết bệnh trên lá chưa sai khác ở mức có ý nghĩa thống kê, còn trên quả giữa CT1, CT2 trước và sau 24 giờ lây bệnh có sự sai khác so với công thức đối chứng.

Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết tỏi đến khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên giống ớt cay sừng

Công thức	Nồng độ (%)	Thời điểm phun	Trên lá		Trên quả	
			Thời gian ủ bệnh (ngày)	Đường kính vết bệnh (mm)	Thời gian ủ bệnh (ngày)	Đường kính vết bệnh (mm)
CT1	1	Trước lây bệnh 24 giờ	6,82 ^a	2,52 ^a	4,91 ^b	6,28 ^b
CT2	2		7,27 ^b	2,50 ^a	4,88 ^b	6,29 ^b
CT3	3		7,46 ^b	2,50 ^a	5,42 ^a	5,29 ^a
CT4	4		7,51 ^b	2,52 ^a	5,40 ^a	4,18 ^a
CT5	5		7,59 ^b	2,48 ^a	5,47 ^a	4,98 ^a
CT6	1	Sau lây bệnh 24 giờ	6,74 ^a	2,48 ^a	5,14 ^a	6,13 ^c
CT7	2		6,72 ^a	2,41 ^a	5,14 ^a	5,89 ^b
CT8	3		6,78 ^a	2,41 ^a	5,25 ^a	5,20 ^a
CT9	4		6,79 ^a	2,40 ^a	5,27 ^a	5,05 ^a
CT10	5		6,80 ^a	2,41 ^a	5,38 ^a	4,90 ^a
CT11 (ĐC)			6,51 ^a	2,75 ^a	5,08 ^a	5,34 ^a
<i>LSD</i> _{0,05}			0,34	0,41	0,42	0,38

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3.3. Đánh giá hiệu lực của dịch chiết tỏi với bệnh thán thư trên giống ớt cay sừng trong điều kiện nhà lưới

Để có cơ sở lựa chọn nồng độ của dịch chiết tỏi ở thí nghiệm ngoài sản xuất,

tiếp tục tiến hành thí nghiệm đánh giá hiệu lực của dịch chiết tỏi nồng độ 3%, 4% và 5% đến khả năng phòng trừ bệnh thán thư *Colletotrichum* spp. trên ớt cay sừng trong điều kiện nhà lưới.

Bảng 3. Hiệu lực của dịch chiết tỏi với bệnh thán thư trên giống ớt cay sừng trong điều kiện nhà lưới

CT	Nồng độ (%)	Sau 5 tuần			Trên cây có quả với chiều dài quả 1 - 2 cm		
		TLB (%)	CSB (%)	HL (%)	TLB (%)	CSB (%)	HL (%)
1	3	100	12,36	58,29 ^a	100	17,59	45,51 ^a
2	4	100	8,54	71,18 ^b	100	10,31	68,06 ^b
3	5	100	7,83	73,57 ^b	100	10,28	68,15 ^b
Đ/C	Nước lã	100	29,63	-	100	32,28	-
<i>LSD</i> _{0,05}				8,27		7,62	
CV (%)				6,49		5,82	

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sử dụng dịch chiết tỏi phun lên cây ớt cay sau 24 giờ lây bệnh kết quả cho thấy: TLB ở tất cả các công thức và thời điểm xử lý dịch chiết đều đạt 100%, nhưng CSB ở các công thức đã có sự sai khác. Khi cây được 5 tuần tuổi TLB ở CT1 là 12,36%, còn ở CT2 và CT3 là 8,54% và 7,83%; hiệu lực phòng trừ ở các CT lần lượt là 58,29%, 71,18%; 73,57%. Khi trên cây có quả với chiều dài 1 - 2 cm CSB ở CT1, CT2, CT3 lần lượt là 17,59%; 10,31%; 10,28%, hiệu lực phòng trừ lần lượt là 45,51%, 68,06%; 68,15%. Như vậy hiệu lực của dịch chiết tỏi đối với nấm

Colletotrichum spp. trên giống ớt cay sừng ở CT1 tại các thời điểm xử lý có sự sai khác ở mức có ý nghĩa thống kê, còn CT2 và CT3 chưa sự sai khác ở mức có ý nghĩa thống kê.

3.4. Đánh giá hiệu lực của dịch chiết tỏi với bệnh thán thư trên giống ớt cay sừng trên đồng ruộng tại huyện Nam Đàn, tỉnh Nghệ An

Thí nghiệm được sử dụng nồng độ 4% của dịch chiết tỏi để đánh giá hiệu lực của dịch chiết tỏi với bệnh thán thư trên giống ớt cay sừng trên đồng ruộng.

Bảng 4. Hiệu lực của dịch chiết tỏi với bệnh thán thư trên giống ớt cay sừng trên đồng ruộng

CT	Thời điểm phun dịch chiết	TLB (%)	CSB (%)	HLPT (%)
1	5 tuần	19,02	15,56	62,52 ^a
2	Trên cây có quả với chiều dài quả 1 - 2 cm	23,18	17,69	57,39 ^a
3	Sau thu hoạch quả lần đầu	35,63	21,47	48,29 ^b
ĐC	Nước lã	48,09	41,52	-
<i>LSD</i> _{0,05}				7,84
				6,73

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Khi cây được 5 tuần và cây có chiều dài quả 1 - 2 cm, nấm mới bắt đầu xuất hiện, xâm nhiễm là thời điểm phun dịch chiết tỏi nên làm giảm khả năng nảy mầm và xâm nhiễm của nấm *Colletotrichum* spp. CSB ở 2 thời điểm này là 15,56% và 17,69%, HLPT đạt 62,52% và 57,39%. (Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Rashid và cs. (2015) đã kết luận rằng dịch chiết tỏi (*Allium sativum*) có tác dụng tốt trong việc phòng chống bệnh thán thư trên cây ớt cay sừng phun ở giai đoạn bệnh mới xuất hiện).

Sau thu hoạch quả lứa đầu, nấm *Colletotrichum* spp. tồn tại trên cây tương đối nhiều tiếp tục tái xâm nhiễm và gây hại, CSB thời điểm này lên tới 21,47% và hiệu lực của dịch chiết tỏi với bệnh thán thư chỉ đạt 48,29%. Ở thời kỳ này hiệu lực phòng trừ bệnh thán thư ớt của dịch chiết tỏi giảm mạnh so với thời kỳ cây 5 tuần và khi cây có quả chiều dài 1 - 2 cm; giữa công thức 2 và công thức 3 đã có sự sai khác có ý nghĩa thống kê, giữa công thức 1 và công thức 2 không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê.

4. KẾT LUẬN

- Sử dụng dịch chiết tỏi ở nồng độ từ 1 - 5% sau 12 giờ và 24 giờ hiệu lực ức chế khả năng nảy mầm của bào tử nấm *Colletotrichum* spp. đạt 100%, sau 48 giờ hiệu lực ức chế của dịch chiết tỏi ở nồng độ từ 2 đến 5% đạt 100% còn dịch chiết tỏi ở nồng độ 1% đạt 87,12%.

- Trong điều kiện nhà lưới phun dịch chiết tỏi với nồng độ 3%, 4%, 5% lên cây ớt cây sau 24 giờ lây bệnh, hiệu lực ức chế tính gây bệnh của *Colletotrichum* spp. khi cây được 5 tuần tuổi đạt 58,29 - 73,57%, cây có quả với chiều dài quả 1 - 2 cm đạt 45,51 - 68,15%;

- Trên đồng ruộng khi cây ớt được 5 tuần và cây có chiều dài quả 1 - 2 cm, sử dụng dịch chiết tỏi với nồng độ 4% đối với bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. HLPT đạt 62,52% và 57,39%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alves K. F., Laranjeira D., Camara M. P., Camara C. A. & Michereff S. J. (2015). Efficacy of plant extracts for anthracnose control in bell pepper fruits under controlled conditions. *Horticultura Brasileira*. 33: 332 - 338.
2. Trần Ngọc Hùng & Nguyễn Thị Liên Thương (2016). Nghiên cứu tạo chế phẩm từ *Trichoderma* sp. kiểm soát bệnh thán thư do *Colletotrichum* spp. gây ra trên cây ớt (*Capsicum frutescens*). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 45: 86 - 92.
3. Rashid M. M., Kabir M. H., Hos.sain M. M., Bhuiyan M. R. & Khan M. A. I. (2015). Eco-friendly management of chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Int. J. Plant Pathol.* 6: 1 - 11.
4. Than P. P., Prihastuti H., Phoulivong S., Taylor P. W. & Hyde K. D. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *J Zhejiang Univ Sci B*. 9: 764 - 78.
5. Than P.P., Jeewon R., Hyde K., Pongsupasamit S., Mongkolporn O. & Taylor P. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*. 57: 562 - 572.

ABSTRACT

Using *Allium sativum* extraction in preventing of anthracnose disease (*Colletotrichum* spp.) on the Spicy chili pepper

Research Allium sativum extract to prevent anthracnose (Colletotrichum spp.) of spicy chili peppers revealed that concentrations from 2 - 5% after 12, 24, and 48 hours of inhibitory effect on the germination of chili peppers. Colletotrichum spp. spores reached 100%, concentration 1% after 48 hours reached 87.12% of inhibitory action. After 24 hours of infection, hot pepper plants in greenhouse settings were sprayed with 3%, 4%, and 5% quantities of garlic extract, significantly inhibiting the pathogenicity of Colletotrichum spp. The result showed that 5 - week old trees reached 58.29 - 73.57%, the trees bearing fruit with a length of 1 - 2 cm reached 58.29 - 73.57%, while in the field, 5 - week old trees and the plants bearing fruit with the length of 1 - 2 cm, using garlic extract with a concentration of 4% was used against anthracnose caused by Colletotrichum spp. prevention effectiveness reached 62.52% and 57.39%.

Keywords: *Allium sativum*, Anthracnose, *Colletotrichum* spp.

ẢNH HƯỞNG CỦA THAN SINH HỌC TỪ VỎ QUẢ CÀ PHÊ VÀ CHẾ PHẨM *Trichoderma* ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ NĂNG SUẤT CÂY CÀ PHÊ VỚI (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)

Đỗ Thị Kiều An^{1*}, Trịnh Công Huyền Vy¹,
Trần Thị Huế¹, Nguyễn Thị Hương Cẩm¹,
Trang Thị Nguyệt Quế¹, Nguyễn Văn Nam¹

¹ Trường Đại học Tây Nguyên
*E-mail liên hệ: dtkan@ttn.edu.vn

TÓM TẮT

Than sinh học là một vật liệu hữu cơ giàu carbon có khả năng cải thiện sức khỏe của đất canh tác, sinh trưởng, phát triển và năng suất của nhiều loại cây trồng. *Trichoderma* spp. là một trong những loại nấm có ích đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp trên toàn thế giới. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê và chế phẩm nấm *Trichoderma* đến tính chất đất cũng như sinh trưởng, phát triển và năng suất của cà phê vối. Một thí nghiệm gồm 4 công thức (CT1: đối chứng, 100% lượng phân NPK vô cơ theo Quy trình Tái canh cây cà phê vối; CT2: 3 tấn than sinh học + 80% lượng phân NPK vô cơ; CT3: 10 kg chế phẩm nấm *Trichoderma*/ha + 80% lượng phân NPK vô cơ; CT4: 3 tấn than sinh học/ha + 10 kg chế phẩm nấm *Trichoderma*/ha + 80% lượng phân NPK vô cơ), 3 lần lặp lại được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên đã được thực hiện trong vườn cà phê vối năm thứ tư trồng trên đất đỏ bazan tại Đắk Lắk. Kết quả sau 5 tháng xử lý cho thấy, mặc dù lượng phân NPK vô cơ đã giảm 20% so với Quy trình nhưng công thức bón than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê vối với lượng 3 tấn/ha (CT2) và 3 tấn than sinh học/ha + 10 kg chế phẩm nấm *Trichoderma*/ha (CT4) đã có ảnh hưởng tốt nhất đến các chỉ tiêu vật lý (độ xốp tăng 12,2 - 12,6%, độ ẩm tăng 11,4 - 13,7%), hóa học (pH_{KCl} tăng 1,02 - 1,03 đơn vị, SOM% tăng 32,8 - 40,8%, CEC tăng 18,1 - 18,6%, N₁₅ tăng 13,4 - 15,6%, P₂O₅_{dt} tăng 22,6 - 29,4%, K₂O_{dt} tăng 5,2 - 6,8%) và sinh học đất (mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ký sinh trong rễ giảm 33,3 - 66,7%, mật độ nấm bệnh *Fusarium* spp. giảm 35,3 - 44,2%), làm tăng khả năng sinh trưởng, phát triển của cây cà phê, góp phần làm tăng năng suất cà phê nhân 24,7 - 29,7% so với ở công thức đối chứng CT1.

Từ khóa: cà phê vối, năng suất, tính chất đất, than sinh học từ vỏ quả cà phê, chế phẩm nấm *Trichoderma*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Than sinh học là một vật liệu hữu cơ giàu carbon được sản xuất bằng quá trình nhiệt phân các vật liệu hữu cơ (gỗ vụn, tàn dư cây trồng, chất thải động vật,...) trong điều kiện nhiệt độ cao (300 - 1.250°C) và không có oxy hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn để không xảy ra phản ứng cháy (Jyoti *et al.*, 2019; Shreya *et al.*, 2021). Do có đặc tính bền vững, xốp, có nhiều lỗ rỗng nhỏ, diện tích bề mặt lớn, tính kiềm, chứa nhiều chất dinh dưỡng và hữu cơ (Shackley *et al.*, 2010; Jyoti *et al.*, 2019), than sinh học đã được dùng để cải tạo sức khoẻ của đất canh tác. Than sinh học đã được chứng minh có khả năng cải tạo các tính chất vật lý của đất như độ xốp, kết cấu đất và khả năng giữ nước của đất, giúp tăng khả năng xâm nhập của rễ và làm giảm tỉ lệ xói mòn (Chang *et al.*, 2021). Các tính chất hóa học của đất như pH, khả năng trao đổi cation (CEC), hàm lượng carbon hữu cơ, hàm lượng các chất dinh dưỡng cũng được cải thiện, đồng thời làm giảm quá trình rửa trôi nitơ, giúp giảm nhu cầu sử dụng phân bón và vôi để duy trì độ phì của đất (Ginebra *et al.*, 2021). Ngoài ra, than sinh học còn có khả năng hấp thụ thuốc bảo vệ thực vật, ngăn chặn sự di chuyển của các hóa chất độc hại này vào nguồn nước mặt hoặc nước ngầm, hạn chế ô nhiễm đất và nước gây ra bởi các hoạt động nông nghiệp (Shreya *et al.*, 2021). Những thay đổi về tính chất vật lý và hóa học của đất này cũng ảnh hưởng đến đặc tính sinh học của đất, tăng cường sự phong phú, đa dạng và hoạt động của vi sinh vật trong đất (Nguyen, 2020). Do đó, việc sử dụng than sinh học để cải thiện chất lượng đất canh tác, nâng

cao sức sản xuất và năng suất của cây trồng đã được nhiều nơi trên thế giới cũng như Việt Nam xem như một giải pháp tiềm năng và bền vững.

Trichoderma spp. là một trong những loại nấm có ích đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp ở khắp nơi trên toàn thế giới. *Trichoderma* hiện đang được sử dụng rộng rãi như là phân bón sinh học do có khả năng cải thiện khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng của cây trồng. Ngoài ra, *Trichoderma* spp. còn được sử dụng như chế phẩm sinh học trong bảo vệ thực vật (Kubheka & Ziena, 2022).

Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu cà phê lớn nhất thế giới, với diện tích cà phê năm 2022 ước đạt khoảng 710,66 nghìn ha và sản lượng đạt hơn 1,84 triệu tấn. Trong đó, Đắk Lắk là tỉnh có diện tích trồng (212.650 ha) và sản lượng cà phê (540.938 tấn) lớn nhất nước ta, chiếm khoảng 30% của cả nước (Lê Văn Đức, 2023). Do đó, lượng vỏ quả cà phê thải ra hàng năm tại đây khoảng 270.000 tấn. Đây là một trong những nguồn nguyên liệu phục vụ việc sấy nông sản và sản xuất than sinh học ứng dụng trong canh tác bền vững tại địa phương. Tại Đắk Lắk, Công ty TNHH Viết Hiền (Buôn Ma Thuột) và Hợp tác xã Bình Minh (CuM'gar) đã ứng dụng công nghệ đốt Flox (nhiệt phân trong điều kiện nhiệt độ 850 - 950°C và không cung cấp oxy), tận dụng nguồn sinh khối và phế phẩm nông nghiệp đa dạng và dồi dào tại địa phương (trong đó có vỏ cà phê) để tạo ra nguồn nhiên liệu sinh học phục vụ việc sấy nông sản. Vỏ cà phê sau khi cháy hết trở thành sản phẩm than sinh học chứa 8,49% chất

hữu cơ; 1,12% N_{ts}; 1,131% P₂O₅ hữu hiệu; 4,6% K₂O hữu hiệu; 0,593% Ca; 0,923% Mg; 8,03 mg/kg Cu; 39,9 mg/kg Zn và tỉ lệ C/N: 3,45.

Trong những năm qua, nhiều tiến bộ khoa học kỹ thuật đã được áp dụng trong sản xuất nhằm tăng năng suất và chất lượng cà phê. Tuy nhiên, ngành hàng cà phê Việt Nam hiện vẫn đang phải đối mặt với nhiều vấn đề, trong đó có việc thoái hóa đất canh tác do việc lạm dụng phân hóa học (Byrareddy *et al.*, 2019) và bệnh vàng lá thối rễ do tuyến trùng và nấm gây hại.

Trước những thực trạng trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng ứng dụng của than sinh học từ vỏ quả cà phê và chế phẩm nấm *Trichoderma* trong việc cải tạo tính chất đất trồng và sinh trưởng, phát triển của cây cà phê, đồng thời, giảm lượng phân bón vô cơ để ứng dụng trong canh tác cà phê bền vững.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Ảnh hưởng của than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê và chế phẩm *Trichoderma* đến tính chất đất trồng cây cà phê vối;

- Ảnh hưởng của than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê và chế phẩm *Trichoderma* đến sinh trưởng, phát triển của cây cà phê vối.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thời gian nghiên cứu

Tháng 6 - 12/2022.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Xã Ea Kao, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk (12°37'9" B; 108°3'9" Đ).

2.2.3. Đối tượng nghiên cứu

- Vườn cà phê vối năm thứ 4 trồng trên đất đỏ bazan.

- Than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê.

- Chế phẩm nấm *Trichoderma*.

2.2.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trên vườn cà phê vối năm thứ 4 trồng trên đất đỏ bazan. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức với 3 lần lặp lại được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên. Mỗi ô cơ sở gồm 12 cây bố trí theo dạng hình chữ nhật (3 hàng × 4 cây). Tổng số ô cơ sở: 4 công thức × 3 lần lặp lại = 12 ô cơ sở. Diện tích ô cơ sở: 108 m². Giữa các ô cơ sở có dải phân cách là một hàng cà phê. Ngoài yếu tố thí nghiệm, các cây cà phê trong lô thí nghiệm được chăm sóc và bón lượng phân NPK vô cơ theo Quy trình Tái canh cây cà phê vối của Bộ Nông nghiệp và PTNT (2016). Các công thức thí nghiệm như sau:

- CT1: đối chứng (không xử lý than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* + 100% lượng phân NPK vô cơ theo Quy trình Tái canh cây cà phê vối).

- CT2: 3 tấn than sinh học + 80% phân NPK vô cơ.

- CT3: 10 kg chế phẩm *Trichoderma* + 80% phân NPK vô cơ.

- CT4: 3 tấn than sinh học + 10 kg chế phẩm *Trichoderma* + 80% phân NPK.

2.2.5. Các chỉ tiêu theo dõi

- Các chỉ tiêu tính chất đất: độ ẩm (TCVN 4048:2011), độ xốp (TCVN

11399:2016), pH_{KCl} (TCVN 5979:2007), N_{ts} (TCVN 10791:2015), P₂O₅ để tiêu (TCVN 8661:2011), K₂O để tiêu (TCVN 8662:2011), khả năng trao đổi cation (CEC) (TCVN 8569:2010), hàm lượng hữu cơ trong đất (SOM) (TCVN 6642:2000), mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất (con/50 g đất) và rễ (con/5 g đất) (Bezooijen, 2006), mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất (CFU/g đất) (Saremi & Saremi, 2013). Lấy mẫu phân tích ở 2 thời điểm: trước xử lý và 5 tháng sau xử lý). Ở mỗi ô cơ sở, lấy 5 mẫu đất theo đường chéo góc ở độ sâu 0 - 30 cm. Mẫu sau khi lấy được trộn đều theo từng công thức thí nghiệm và lấy khoảng 1 kg cho vào từng túi riêng biệt theo TCVN 7538-2:2005 (ISO 10381-2:2002) để phân tích.

- Các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của cây cà phê: theo dõi ở 2 thời điểm: trước xử lý (TXL) và 5 tháng sau xử lý (SXL). Mỗi công thức, theo dõi 3 cây có định các chỉ tiêu sau: chiều dài cành dự trữ (cm): đo từ chùm quả cuối cùng của cành đến mút cành; số đốt/cành dự trữ; số quả/chùm. Mỗi cây, đánh dấu cố định để theo dõi 4 cành, phân bố theo 4 hướng ở tầng giữa. Trên mỗi cành, theo dõi cố định 3 chùm quả/cành.

- Các chỉ tiêu năng suất và chất lượng cà phê: theo dõi tại thời điểm thu hoạch: năng suất quả tươi (tấn/ha), tỉ lệ quả tươi:nhân; năng suất cà phê nhân (tấn/ha).

2.2.6. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu sau khi thu thập được tính giá trị trung bình, tỉ lệ phần trăm, phân tích phương sai một nhân tố, kiểm định sự sai khác giữa các nghiệm thức bằng kiểm định

Fisher test và vẽ đồ thị sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2016 và MiniTab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* đến tính chất đất trồng cây cà phê vối

3.1.1. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* đến lý tính đất

Kết quả phân tích lý tính đất cho thấy, tại thời điểm TXL, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các công thức thí nghiệm về chỉ tiêu độ ẩm và độ xốp đất. Sau 5 tháng xử lý, độ xốp đất ở 2 công thức bón than sinh học (CT2 và CT4) đều tăng hơn so với ở thời điểm TXL và khác biệt rất có ý nghĩa ($p < 0,01$) so với ở công thức đối chứng CT1 (bảng 1). Độ xốp đất ở công thức chỉ bón than sinh học (CT2) và bón kết hợp với chế phẩm nấm *Trichoderma* (CT4) đã lần lượt tăng 11,4% và 13,7% so với ở công thức đối chứng CT1. Ngược lại, độ xốp và độ ẩm đất ở công thức chỉ áp dụng chế phẩm *Trichoderma* (CT3) tuy cao hơn một chút so với ở công thức đối chứng nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy việc kết hợp bón than sinh học và nấm *Trichoderma* vào đất đã có thể cải thiện khả năng giữ nước trong đất, thông qua việc tăng độ xốp và độ ẩm của đất. Hiệu quả này có được chủ yếu là do tác dụng của than sinh học đối với lý tính đất trồng cà phê vối. Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu của Jyoti *et al.* (2019); Lương Hữu Thành và cs. (2020); Saffari *et al.* (2021). Kết quả này có được là do đất được bón than sinh học có khả năng lưu trữ nước tốt hơn nhờ các cấu trúc rỗng của than sinh học (Shackley *et al.*, 2010; Beusch, 2021).

Bảng 1. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm sinh học *Trichoderma* đến lý tính đất trồng cà phê vối

Công thức thí nghiệm	Độ xốp (%)		Độ ẩm (%)	
	TXL	SXL	TXL	SXL
CT1	55,94	57,30 ^b	23,67	24,57 ^b
CT2	56,39	64,53 ^a	23,93	27,37 ^a
CT3	55,73	59,60 ^b	23,77	25,40 ^b
CT4	55,70	64,26 ^a	24,37	27,93 ^a
<i>F</i> - test	<i>ns</i>	**	<i>ns</i>	**

Ghi chú: các giá trị trung bình (theo cột) theo sau bởi cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê; *ns*: khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

3.1.2. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* đến hóa tính đất

Kết quả phân tích hóa tính đất được trình bày trong bảng 2 cho thấy các công thức thí nghiệm đã có ảnh hưởng tích cực làm tăng pH_{KCl} , SOM% và CEC của đất. Tại thời điểm TXL, các chỉ tiêu pH_{KCl} , SOM% và CEC ở các công thức thí nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa. Tuy nhiên, SXL, pH_{KCl} , SOM% và CEC ở các công thức có bón than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* đều cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với ở công thức đối chứng. So với thời điểm TXL, pH_{KCl} ở công thức chỉ bón than sinh học (CT2) và bón kết hợp với chế phẩm *Trichoderma* (CT4) đều cao hơn, tăng 0,75 đơn vị. Ngược lại, pH_{KCl} ở công thức đối chứng (CT1) lại giảm 0,33 đơn vị. Sự gia tăng pH_{KCl} của đất của các công thức CT2, CT3 và CT4 có thể là do gia tăng khả năng phân hủy chất hữu cơ ở những công thức có bón bổ sung vi sinh vật phân hủy trong chế phẩm *Trichoderma* (Sopialena *et al.*, 2022) và do khả năng làm giảm hàm lượng Al di động trong đất chua ở những công thức

có bón bổ sung than sinh học (Mbagwu & Piccolo, 1997). Ngoài ra, than sinh học có tính kiềm, chứa chất hữu cơ và nhiều chất dinh dưỡng, do đó, việc bổ sung than sinh học vào đất đã làm tăng độ pH của đất, tăng hàm lượng hữu cơ và tăng khả năng trao đổi cation của đất (Dume *et al.*, 2016).

So với ở công thức đối chứng, hàm lượng mùn trong đất (SOM%) ở các công thức chỉ bón than sinh học (CT2) và bón kết hợp với chế phẩm *Trichoderma* (CT4) cao hơn 1,27% và 1,58%, tương đương tăng 32,8% và 40,8%. Cấu trúc xốp, chứa nhiều carbon hữu cơ của than sinh học là điều kiện thuận lợi cho nhiều vi sinh vật có ích hoạt động, trong đó có các vi sinh vật phân hủy chất hữu cơ thành chất mùn (Jyoti *et al.*, 2019). So với ở công thức đối chứng CT1, hàm lượng mùn ở công thức bón chế phẩm *Trichoderma* (CT3) cao hơn 1,05%, tương đương tăng 27,1%. Kết quả này có được là do khả năng phân hủy chất hữu cơ của các loài nấm *Trichoderma* có trong chế phẩm đã áp dụng, do đó, làm tăng hàm lượng mùn trong đất (Waghunde *et al.*, 2016).

So với ở công thức đối chứng CT1, CEC ở các công thức CT2, CT3 và CT4 lần lượt cao hơn 3,65; 3,10 và 3,55 lđl/100g đất, tương ứng tăng 18,6%; 15,8% và 18,1%. Tuy nhiên, không có

sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chỉ tiêu CEC giữa các công thức bón than sinh học (CT2) và chế phẩm *Trichoderma* (CT3) cũng như công thức bón kết hợp (CT4).

Bảng 2. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm sinh học *Trichoderma* đến hóa tính đất trồng cây cà phê vối

Công thức	pH _{KCl}		SOM (%)		CEC (lđl/100 g đất)	
	TXL	SXL	TXL	SXL	TXL	SXL
CT1	3,58	3,25 ^c	4,46	3,89 ^b	19,43	19,64 ^c
CT2	3,52	4,27 ^a	4,39	5,14 ^a	19,35	23,29 ^b
CT3	3,62	3,90 ^b	4,77	4,92 ^a	19,01	22,74 ^{ab}
CT4	3,53	4,28 ^a	4,75	5,45 ^a	19,04	23,19 ^a
<i>F - test</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	**	<i>ns</i>	**

Ghi chú: các giá trị trung bình (theo cột) theo sau bởi cùng ký tự thể hiện sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê; ns: khác biệt không có ý nghĩa; *: khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$); **: khác biệt rất có ý nghĩa ($p < 0,01$).

Kết quả phân tích hàm lượng các chất dinh dưỡng đa lượng trong đất trình bày trong bảng 3 cho thấy tuy lượng phân hóa học ở các công thức bón than sinh học và/hoặc chế phẩm nấm *Trichoderma* ít hơn 20% so với ở công thức đối chứng nhưng ở thời điểm SXL, hàm lượng N_{ts}, P₂O_{5dt}, K₂O_{dt} trong đất trồng cà phê ở các công thức này đều cao hơn so với ở thời điểm TXL cũng như so với ở công thức đối chứng CT1. Tuy nhiên, chỉ ở 2 công thức có bón than sinh học, hàm lượng N_{ts} và K₂O_{dt} mới khác biệt có ý nghĩa so với ở công thức đối chứng. Điều này chứng tỏ việc bón than sinh học đã có tác dụng tích cực làm tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng đa lượng trong đất trồng cà phê. Kết quả này phù hợp với nhiều kết quả

nghiên cứu trong và ngoài nước (Lương Hữu Thành và cs., 2020; Laird *et al.*, 2010). Theo Jyoti *et al.* (2019), than sinh học giúp cải thiện độ màu mỡ của đất thông qua hai cơ chế: (i) bổ sung chất dinh dưỡng cho đất do bản thân than sinh học cũng chứa nhiều chất dinh dưỡng và (ii) giữ lại chất dinh dưỡng được bổ sung cho đất từ việc bón phân. Ưu điểm chính của than sinh học là hấp thụ và giải phóng từ từ chất dinh dưỡng cho cây trồng sử dụng (Deluca *et al.*, 2015). Ngoài ra, than sinh học còn giúp ngăn chặn khả năng phân bón bị thất thoát do chảy tràn hoặc thấm xuống tầng đất sâu. Điều này cho phép sử dụng ít phân bón hơn và giảm ô nhiễm hóa chất nông nghiệp đến môi trường xung quanh (Cao *et al.*, 2018).

Bảng 3. Ảnh hưởng của than sinh học đến hàm lượng các chất dinh dưỡng đa lượng trong đất

Công thức	N _{ts} (%)		P ₂ O _{5dt} (mg/100 g đất)		K ₂ O _{dt} (mg/100 g đất)	
	TXL	SXL	TXL	SXL	TXL	SXL
CT1	0,191	0,186 ^c	17,04	17,39 ^c	20,10	20,52 ^c
CT2	0,192	0,211 ^{ab}	17,61	21,32 ^{ab}	20,05	21,58 ^{ab}
CT3	0,190	0,198 ^{bc}	17,46	18,75 ^b	20,15	20,96 ^{bc}
CT4	0,191	0,215 ^a	17,22	22,50 ^a	20,72	21,91 ^a
<i>F - test</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	*

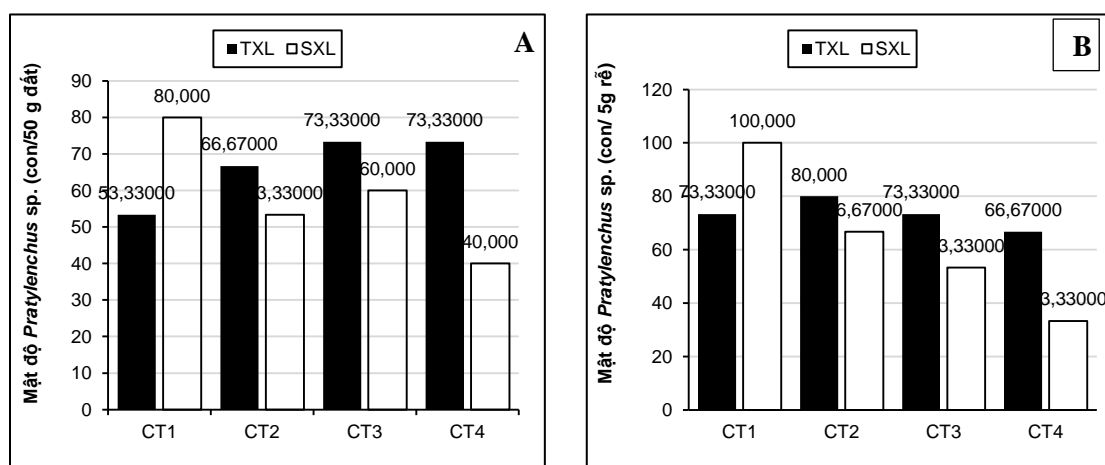
Ghi chú: các giá trị trung bình (theo cột) theo sau bởi cùng ký tự thể hiện sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê; ns: khác biệt không có ý nghĩa; *: khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$).

SXL, hàm lượng P₂O_{5dt} ở công thức bón kết hợp than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* (CT4) đạt cao nhất (22,50 mg/100 g đất), cao hơn công thức đối chứng CT1 29,4% nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với ở công thức chỉ bón than sinh học (CT2). Kết quả này cũng cho thấy việc bón bổ sung chế phẩm *Trichoderma* cũng có tác dụng làm tăng hàm lượng P₂O_{5dt} trong đất mặc dù đã giảm 20% lượng phân bón hóa học so với ở công thức đối chứng CT1.

3.1.3. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* đến sinh tính đất trồng cà phê vối

Than sinh học có cấu trúc xốp, diện tích bề mặt cao và khả năng hấp thụ chất hữu cơ hòa tan, chất khí và chất dinh dưỡng vô cơ cao nên có khả năng cung cấp một môi trường sống rất phù hợp cho nhiều loại vi sinh vật và tuyến trùng cư trú (Thies & Rillig, 2009). Do đó, việc bón than sinh học có thể ảnh hưởng đến mật độ tuyến trùng ký sinh *Pratylenchus* sp. và nấm bệnh *Fusarium* spp., hai tác nhân ký sinh quan trọng gây bệnh vàng lá thối rễ làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh

trưởng và phát triển của cây cà phê vối. Kết quả theo dõi mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cho thấy tất cả các công thức thí nghiệm đã có tác dụng làm giảm mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong rễ cũng như trong đất trồng cà phê vối (biểu đồ 1). Điều này thể hiện ở mật độ tuyến trùng trong đất cũng như trong rễ tại thời điểm SXL ở công thức đối chứng CT1 đều tăng 50% và 36% so với TXL nhưng lại đều giảm ở cả 3 công thức thí nghiệm. Đáng chú ý, mật độ tuyến trùng ở công thức bón kết hợp than sinh học và chế phẩm nấm *Trichoderma* (CT4) giảm xuống còn thấp nhất, chỉ còn 40,0 con/50 g đất và 33,3 con/5 g rễ, khác biệt có ý nghĩa so với ở công thức chỉ bón than sinh học (CT2). Kết quả thí nghiệm 5 năm của Liu *et al.* (2020) cho thấy giá trị phong phú tương đối của tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở đất có áp dụng than sinh học đã giảm hơn một nửa so với ở công thức không bón than sinh học, giảm từ 28,74% xuống còn 13,98%. Kết quả nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu trong thời gian 3 năm của Oladele *et al.* (2021) về ảnh hưởng của than sinh học đến tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất trồng lúa nước ở Tây Phi.

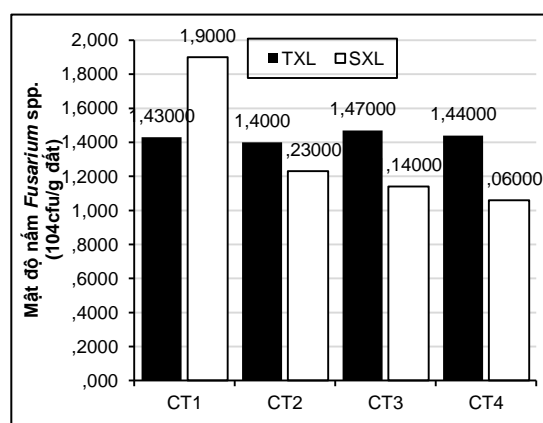


Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của lượng than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* đến mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất (A) và trong rễ (B) cây cà phê với

Ghi chú: giá trị trung bình của các cột có cùng ký tự thường (cột màu đen) hoặc ký tự in hoa (cột màu trắng) thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Tương tự như mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất và trong rễ, SXL, mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất cũng có chiều hướng giảm ở các công thức thí nghiệm nhưng vẫn tăng ở công thức đối chứng (biểu đồ 2). Đáng chú ý, mật độ nấm bệnh *Fusarium* spp. trong đất cũng giảm xuống còn thấp nhất ở công thức xử lý kết hợp than sinh học và chế phẩm nấm *Trichoderma* (CT4) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ở công thức đối chứng (CT1) và công thức chỉ xử lý than sinh học (CT2). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Rahayu & Sari (2017) cho rằng than sinh học có khả năng làm giảm tuyến trùng ký sinh trong vườn cà phê, phù hợp với nghiên cứu của Rogovska *et al.* (2017) về hiệu quả của than sinh học đối với bệnh thối rễ do nấm *Fusarium virguliforme* gây ra. Trong số 3 công thức thí nghiệm, công thức bón kết hợp than sinh học và chế phẩm nấm *Trichoderma* (CT4) đem lại hiệu quả làm

giảm mật số tuyến trùng *Pratylenchus* sp. và nấm bệnh *Fusarium* spp. tốt nhất. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của da Silva *et al.* (2022) và được giải thích là do việc áp dụng than sinh học và



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm sinh học *Trichoderma* đến mật độ nấm *Fusarium* spp. trong đất trồng cà phê

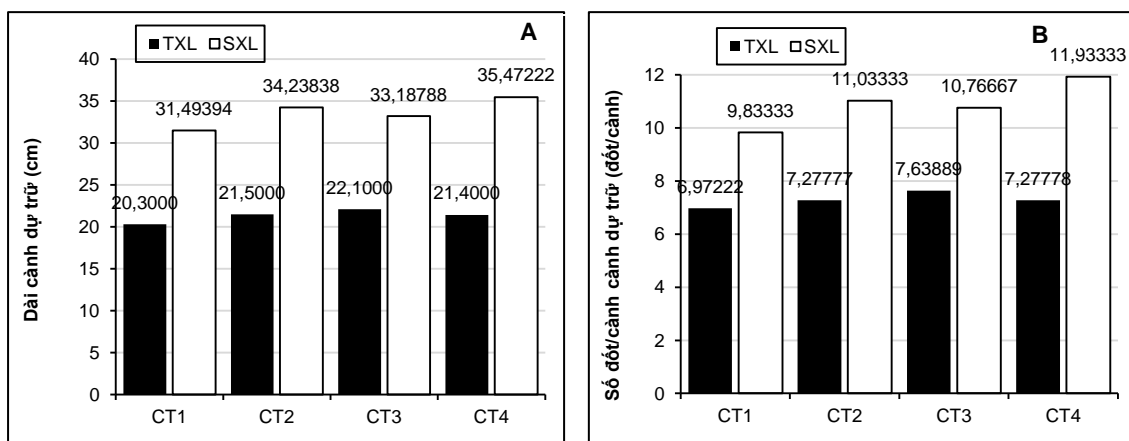
Ghi chú: các giá trị trung bình của các cột cùng màu có cùng ký tự thường (cột màu đen) hoặc ký tự in hoa (cột màu trắng) không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

nấm *Trichoderma* đã làm thay đổi các chỉ tiêu đất như pH, P, K và hàm lượng carbon hữu cơ trong đất. Bón bổ sung than sinh học được biết là gây ra phản ứng môi (priming) ở thực vật, là phản ứng sinh lý gia tăng phòng vệ cho phép thực vật chống lại côn trùng và các tác nhân gây bệnh (Huang *et al.*, 2015). Ngoài ra, than sinh học còn gián tiếp ngăn chặn mầm bệnh thực vật bằng cách thúc đẩy sự xâm nhập và phát triển của các vi sinh vật có lợi, tăng khả năng đối kháng với các tác nhân gây hại (Lehmann *et al.*, 2011). *Trichoderma* spp. được biết là có khả năng hạn chế các bệnh do nấm và tuyến trùng ký sinh thực vật gây ra (Nguyễn Văn Nam và cs., 2020; Kubheka & Zienna, 2022). Khi bón kết hợp than sinh học và chế phẩm *Trichoderma*, than sinh học đóng vai trò là chất mang, làm tăng tỉ lệ sống của nấm *Trichoderma* spp. sau khi

được bón vào đất, giúp nấm phát huy hiệu quả phòng chống các tác nhân gây hại, trong đó có tuyến trùng ký sinh *Pratylenchus* sp. và nấm bệnh *Fusarium* spp. (deTender *et al.*, 2016; Muter, 2017).

3.2. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm *Trichoderma* đến sinh trưởng, phát triển của cây cà phê vối

Kết quả theo dõi 2 chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê vối giai đoạn kinh doanh trình bày trong biểu đồ 3 cho thấy tuy giảm 20% lượng phân bón hóa học so với ở công thức đối chứng, việc bón bổ sung 3 tấn than sinh học/ha và/hoặc 10 kg chế phẩm nấm *Trichoderma*/ha không những không làm giảm sinh trưởng của cây mà còn làm tăng dài cành dự trữ và số đốt/cành dự trữ so với ở công thức đối chứng, là tiền đề để cây cà phê vối cho năng suất cao trong năm tiếp theo.



Biểu đồ 3. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm sinh học *Trichoderma* đến dài cành dự trữ (A) và số đốt trên cành dự trữ (B) của cây cà phê vối

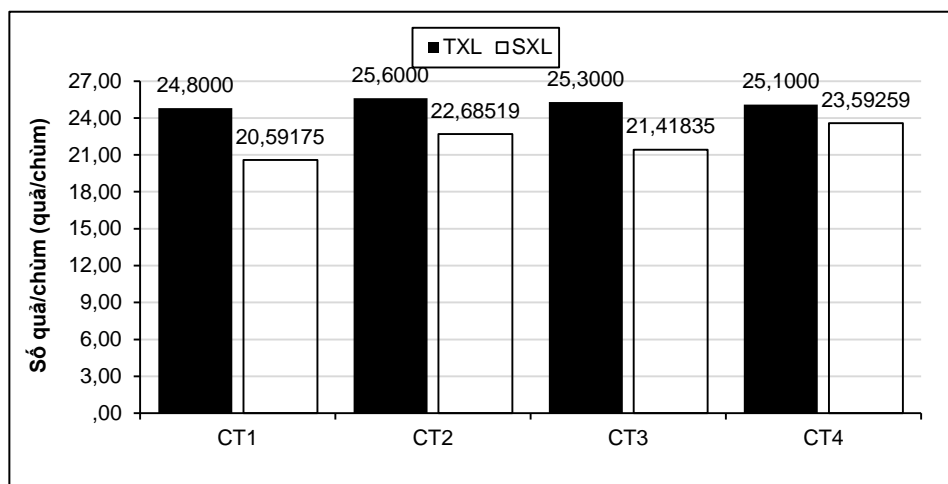
Ghi chú: các giá trị trung bình của các cột cùng màu có cùng ký tự thường (cột màu đen) hoặc ký tự in hoa (cột màu trắng) không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Tương tự như chỉ tiêu số đốt/cành dự trữ, số quả/chùm trung bình ở 2 công thức có bón than sinh học đều cao hơn và khác

biệt có ý nghĩa thống kê so với ở công thức đối chứng CT1 (biểu đồ 4). Tại thời điểm SXL, số quả/chùm ở công thức chỉ

bón than sinh (CT2) và bón kết hợp với chế phẩm *Trichoderma* (CT4) đã lần lượt cao hơn công thức đối chứng 10,2% và 14,6%. Đất được bón than sinh học và chế phẩm nấm *Trichoderma* có lý, hóa và sinh tính đất tốt hơn, làm tăng hàm lượng các

chất dinh dưỡng trong đất, giúp giữ cho các chất dinh dưỡng ít bị thất thoát và giúp cây hấp thu dinh dưỡng tốt hơn, hạn chế tuyến trùng và nấm bệnh gây hại, từ đó, giúp cây cà phê sinh trưởng tốt hơn, góp phần làm tăng năng suất thu hoạch.



Biểu đồ 4. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm sinh học *Trichoderma* đến số quả/chùm của cây cà phê vối

Ghi chú: các giá trị trung bình của các cột cùng màu có cùng ký tự thường (cột màu đen) hoặc ký tự in hoa (cột màu trắng) không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Kết quả trình bày trong bảng 3 cho thấy việc bón than sinh học và/hoặc chế phẩm nấm *Trichoderma* đã có tác động tích cực đến năng suất cà phê. Tuy lượng phân hóa học ở 2 công thức bón than sinh học (CT2 và CT4) ít hơn 20% so với ở công thức đối chứng CT1, năng suất cà phê tươi cũng như năng suất cà phê nhân ở 2 công thức này đều cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với ở công thức đối chứng. So với ở công thức đối chứng, năng suất cà phê tươi ở công thức chỉ bón than sinh học (CT2) và bón kết hợp với chế phẩm nấm *Trichoderma* (CT4) đã lần lượt tăng 23,0% và 28,2%. Tương tự, năng suất cà phê nhân cũng lần lượt tăng

24,7% ở công thức chỉ bón than sinh học (CT2) và tăng 29,7% ở công thức bón kết hợp than sinh học và chế phẩm nấm *Trichoderma* (CT4). Tuy năng suất cà phê tươi cũng như năng suất cà phê nhân ở công thức chỉ xử lý chế phẩm *Trichoderma* (CT3) cao hơn so với ở công thức đối chứng (CT1) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này chứng tỏ giảm 20% lượng phân bón hóa học nhưng áp dụng 10 kg chế phẩm nấm *Trichoderma* cũng có thể giúp cây cà phê cho năng suất tương tự như khi bón 100% lượng phân hóa học theo Quy trình Tái canh cây cà phê vối.

Bảng 3. Ảnh hưởng của than sinh học và chế phẩm sinh học *Trichoderma* đến năng suất cà phê vối

Công thức	Năng suất quả tươi (tấn/ha)	Tỉ lệ tươi/nhân	Năng suất cà phê nhân (tấn nhân/ha)
CT1	14,52 ^b	4,25	3,416 ^c
CT2	17,85 ^a	4,19	4,261 ^{ab}
CT3	16,06 ^b	4,21	3,818 ^{bc}
CT4	18,61 ^a	4,20	4,431 ^a
<i>F</i> - test	**	<i>ns</i>	**

Ghi chú: các giá trị trung bình (theo cột) theo sau bởi cùng ký tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất $p < 0,01$.

4. KẾT LUẬN

Trong điều kiện thí nghiệm, công thức bón kết hợp 3 tấn than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê và 10 kg chế phẩm nấm *Trichoderma* (CT4) có tác dụng tiết kiệm được 20% lượng phân NPK vô cơ theo Quy trình Tái canh cà phê vối đồng thời cải tạo các chỉ tiêu lý, hóa tính tương tự như ở công thức bón 3 tấn than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê (CT2): độ xốp tăng 12,2 - 12,6%, độ ẩm tăng 11,4 - 13,7%, pH_{KCl} tăng 1,02 - 1,03 đơn vị, SOM% tăng 32,8 - 40,8%, CEC tăng 18,1 - 18,6%, N_{ts} tăng 13,4 - 15,6%, P₂O_{5dt} tăng 22,6 - 29,4%, K₂O_{dt} tăng 5,2 - 6,8%, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ký sinh trong rễ giảm 33,3 - 66,7%, mật độ nấm bệnh *Fusarium* spp. giảm 35,3 - 44,2%, làm tăng chiều dài cành dự trữ 8,7 - 12,6%, tăng số quả/chùm 10,2 - 14,6%, góp phần tăng năng suất cà phê nhân 24,7 - 29,7% so với ở công thức đối chứng CT1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Văn Đức (2023). Báo cáo đề dẫn về cà phê chất lượng cao của Việt Nam, Kỳ yếu Hội thảo Xây dựng chuỗi ngành hàng cà phê Việt Nam chất lượng cao gắn với tăng trưởng xanh và phát triển bền vững, Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, tr. 5 - 26.
- Bộ Nông nghiệp và PTNT (2016). Quy trình Tái canh cà phê vối.
- Lương Hữu Thành, Vũ Thuý Nga, Đàm Trọng Anh, Ngô Thị Hà, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Hứa Thị Sơn và Nguyễn Kiều Băng Tâm (2020). Ảnh hưởng của than sinh học sản xuất từ vỏ quả cà phê đến chất lượng đất và năng suất cây hồ tiêu, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 5(114): 39 - 43.
- Beusch, C. (2021). "Biochar as a soil ameliorant: How biochar properties benefit soil fertility - A review", *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 09(10): 28 - 46.
- Bezooijen, J. V. (2006). *Methods and Techniques for Nematology*. Wageningen.
- Byrareddy, V., Kouadio, L., Mushtaq, S. and Stone, R. (2019). Sustainable production of robusta coffee under a changing climate: A 10-year monitoring of fertilizer management in coffee farms in Vietnam and Indonesia, *Agronomy*, 9(9): 499 - 517.
- Cao, Y., Gao, Y., Qi, Y. and Li, J. (2018). Biochar-enhanced composts reduce the potential leaching of nutrients and heavy metals and suppress plant - parasitic nematodes in excessively fertilized cucumber soils, *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8): 7589 - 7599.
- Chang, Y., Rossi, L., Zotarelli, L., Gao, B., Shahid, M. and Sarkhosh, A. (2021). Biochar

- improves soil physical characteristics and strengthens root architecture in Muscadine grape (*Vitis rotundifolia* L.), *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8: 7 - 17.
9. da Silva, J. S. A., de Medeiros, E. V., da Costa, D. P., de Souza, C. A. F., de Oliveira, J. B., da França, R. F., Souza - Motta, C. M., de Sousa Lima, J. R. và Hammecker, C. (2022a), "Biochar and *Trichoderma aureoviride* URM 5158 as alternatives for the management of cassava root rot", *Applied Soil Ecology*, 172: 104353.
 10. de Tender, C., Debode, J., Vandecasteele, B., D'Hose, T., Cremelie, P., Haegeman, A., Ruttink, T., Peter, D. và Maes, M. (2016). Biochar as peat amendment to reduce the use of fertilizers and fungicides in strawberry production.
 11. Deluca, T., Gundale, M. J., Mackenzie, M. D. and Jones, D. (2015). Biochar effects on soil nutrient transformations. In: Lehmann, J. and Joseph, S. (eds.). *Biochar for environmental management: Science and technology* (pp. 421 - 454). Routledge.
 12. Dume, B. (2016). "Effect of biochar on soil properties and lead (Pb) availability in a military camp in South West Ethiopia", *African Journal of Environmental Science and Technology*, Vol. 10(3): 77 - 85.
 13. Ginebra, M., Muñoz, C., Calvelo Pereira, R., Doussoulin, M. and Zagal, E. (2021). Biochar impacts on soil chemical properties, greenhouse gas emissions and forage productivity: A field experiment, *Science of The Total Environment*, 806: 150465.
 14. Huang, W. K., Ji, H. - l., Gheysen, G., Debode, J. và Kyndt, T. (2015). "Biochar-amended potting medium reduces the susceptibility of rice to root-knot nematode infections", *BMC Plant Biology*, 15(1): 267 - 281.
 15. Jyoti, R., Jyoti, S. và Pankaj, S. (2019). Biochar: A sustainable approach for improving plant growth and soil properties. In: Vikas, A. and Peeyush, S. (eds.), *Biochar - An imperative amendment for soil and the environment*. IntechOpen Rijeka.
 16. Kubheka, B. P. và Ziena, L. W. (2022). Trichoderma: A biofertilizer and a bio-fungicide for sustainable crop production. In: Cezar, J. F. (ed.), *Trichoderma - Technology and uses*. IntechOpen, Rijeka.
 17. Laird, D. A., Fleming, P., Davis, D. D., Horton, R., Wang, B. and Karlen, D. L. (2010). Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil, *Geoderma*, 158(3 - 4): 443 - 449.
 18. Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C. và Crowley, D. (2011). "Biochar effects on soil biota - A review", *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9): 1812 - 1836.
 19. Liu, X., Zhang, D., Li, H., Qi, X., Gao, Y., Zhang, Y., Han, Y., Jiang, Y. and Li, H. (2020). Soil nematode community and crop productivity in response to 5-year biochar and manure addition to yellow cinnamon soil, *BMC Ecology*, 20(1): 39 - 51.
 20. Mbagwu, J.S.C. and Piccolo, A. (1997). "Effects of Humic Substances from Oxidized Coal on Soil Chemical Properties and Maize Yield". In: Drozd, J., Gonet, S.S., Senesi, N. and Weber, J. (ed.), *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and in Environmental Protection, Poland Polish Society of Humic Substances*, Wroclaw, pp. 921 - 925.
 21. Muter, O. (2017). "Effect of biochar and Trichoderma application on fungal diversity and growth of *Zea mays* in a sandy loam soil", *Environmental and Experimental Biology* Vol. 15: 289 - 296.
 22. Nguyen, H. (2020). Biochar for maintaining soil health. In: Giri, B. and Varma, A. (eds.). *Soil health* (pp. 21 - 46). Springer.
 23. Oladele, S., Adeyemo, A., Awodun, M., Adegaye, A. and Ingold, M. (2021). Impact of biochar amendment on soil nematode communities in a West African rain - fed rice cropland, *Nematology*, 24(2): 1 - 12.
 24. Rahayu, D. S. và Sari, N. P. (2017). "Development of *Pratylenchus coffeae* in biochar applied soil, coffee roots and its effect on plant growth", *Pelita Perkebunan*, 33(1): 24 - 32.
 25. Rogovska, N., Laird, D., Leandro, L. và Aller, D. (2017). "Biochar effect on severity of soybean root disease caused by *Fusarium virguliforme*", *Plant and soil*, 413: 111 - 126.
 26. Saffari, N., Hajabbasi, M., Shirani, H., Mosaddeghi, M. R. và Owens, G. (2021). "Influence of corn residue biochar on water retention and penetration resistance in a

- calcareous sandy loam soil”, *Geoderma*, 383: 114734.
27. Shackley, S., Sohi, S., Brownsort, P., Carter, S., Cook, J., Cunningham, C., Gaunt, J., Hammond, J., Ibarrola, R. and Mašek, O. (2010). *An assessment of the benefits and issues associated with the application of biochar to soil*. London: Defra
28. Shreya, D., Samanyita, M., Gayatri, S., Mausami, R. và Kiran, P. (2021). Biochar: A sustainable approach for improving soil health and environment. In: António, V. and Silvio Carlos, R. (eds.), *Soil erosion*. Intech Open Rijeka.
29. Sopiálana, S., Alexander, M. và Maria Fatima, N. (2022). “Impact of *Metarhizium* sp. and *Trichoderma* sp. on soil fertility and growth of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) in post-mining land”, *KnE Life Sciences*, 7(3): 409 - 426.
30. Thies, J. and Rillig, M. (2009). Characteristics of biochar: biological properties. In: Lehmann, M. and Joseph, S. (eds.). *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, London: Earthscan, pp. 85 - 105.
31. Waghunde, R., Shelake, R. và Sabalpara, A. (2016). “*Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment”, *African Journal of Agricultural Research*, 11(22): 1952 - 1196.

ABSTRACT

Effects of coffee - husk biochar and *Trichoderma* formulation on growth and yeilds of Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)

*Biochar is an organic carbon - rich material, known to be beneficial to improve soil quality, thereby enhancing plant growth, crop yield and quality. Trichoderma spp. is one of the beneficial fungi that has been widely studied and applied in agriculture. This study was conducted with the objectives of determining the effects of coffee - husk biochar and Trichoderma formulation on the physical, chemical and biological soil properties as well as on the Robusta coffee growth and yield. An experiment consisted of 4 treatments (CT1: control, 100% NPK; CT2: 3 tons of biochar/ha + 80% NPK; CT3: 10 kg of Trichoderma formulation + 80% NPK; CT4: 3 tons of biochar/ha + 10 kg of Trichoderma formulation + 80% NPK), 3 replicates in a randomized complete block design was carried out on 4th - year coffee trees planted on red basalt soil in Dak Lak province. The results showed that after 5 months of treatment, although the amount of inorganic NPK fertilizer was reduced by 20%, the treatments which applied 3 tons of coffee - husk biochar (CT2) and in combination with 10 kg of Trichoderma formulation (CT4) showed the best effects on soil physical properties (porosity increased by 12.2 - 12.6%, moisture increased by 11.4 - 13.7%) soil chemical properties (pH_{KCl} increased by 1.02 - 1.03, SOM% increased by 32.8 - 40.8%, CEC increased by 18.1 - 18.6%, N% increased by 13.4 - 15.6%, P₂O₅ increased by 22.6 - 29.4%, K₂O increased by 5.2 - 6.8%) and soil biological properties (density of *Pratylenchus* sp. in coffee roots reduced by 33.3 - 66.7%, density of the pathogen *Fusarium* spp. reduced by 35.3 - 44.2%), leading to enhancing growth of coffee trees, resulted in an increase of 24.7 - 29.7% of the yield of green coffee beans as compared with the control treatment.*

Keywords: coffee-husk biochar, Robusta coffee, soil properties, *Trichoderma* formulation, yield.

TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC CỦA NANO CHITOSAN/SALICYLIC AXIT ĐỐI VỚI BỆNH ĐỐM NÂU THANH LONG (*Neoscytalidium dimidiatum*) TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Lê Nghiêm Anh Tuấn^{1*}, Bùi Duy Du¹,
Phạm Trần Yến Nhi², Phạm Thanh Vũ³,
Chu Văn Khương³, Chu Trung Kiên³

¹ Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
² Trường Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh
³ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam,
Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
* E-mail liên hệ: lenghiemanhtuan@gmail.com

TÓM TẮT

Bệnh đốm nâu là một trong những bệnh hại cây thanh long quan trọng và phổ biến nhất. Công nghệ nano đã được áp dụng để kiểm soát bệnh thực vật và cải thiện sự phát triển của cây trồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày việc thực hiện điều chế các hạt nano salicylic axit (SA) ổn định trong chitosan (CS) khối lượng phân tử trung bình (M_w 80.020 g/mol) bằng kỹ thuật sol-gel thu được chế phẩm nano SA/CS và đánh giá hiệu lực của chúng trong việc kiểm soát bệnh đốm nâu trên cây thanh long. Chế phẩm nano SA/CS chứa CS 5%/SA 0,5% được pha loãng thành các nồng độ hoạt chất 330 ppm (300 ppm CS/30 ppm SA), 440 ppm (400 ppm CS/40 ppm SA) và 550 ppm (500 ppm CS/50 ppm SA) để thí nghiệm. Kết quả cho thấy 03 nghiệm thức xử lý bởi nano SA/CS trên đều không gây độc cho cây thanh long khi sử dụng đến nồng độ hoạt chất 550 ppm. Nghiệm thức nano SA/CS 550 ppm (NT3) cho thấy hiệu lực kiểm soát bệnh đốm nâu trên cây thanh long cao hơn các nghiệm thức còn lại trong việc giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh. Hơn nữa, NT3 đạt hiệu lực lên đến 83,33% so với đối chứng âm (NT5) trong điều kiện nhà lưới. Nghiên cứu chỉ ra tiềm năng sử dụng nano SA/CS làm chất kích kháng để quản lý bệnh đốm nâu trên cây thanh long.

Từ khóa: nano chitosan/salicylic, bệnh đốm nâu, thanh long.

1. GIỚI THIỆU

Thanh long (*Hylocereus* spp.) là một trong những loại cây ăn trái được trồng

chủ lực ở Việt Nam (Uyên, 2022), trồng tập trung chủ yếu tại Bình Thuận, Long An và Tiền Giang và lan rộng sang một số tỉnh, thành trong cả nước với tổng diện tích đạt 55 ngàn ha, sản lượng 487.968 tấn

Người phân biên: TS. Trần Thế Lâm

gồm giống thanh long ruột trắng và ruột đỏ (Nguyen, 2020). Tuy nhiên, việc canh tác tập trung, quy mô lớn cũng đã phát sinh nhiều dịch bệnh ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của thanh long. Hiện nay, đã ghi nhận được 16 loại bệnh hại thanh long do nấm, vi khuẩn hoặc tuyến trùng gây ra (Uyên, 2022), trong đó bệnh đốm nâu là một trong những bệnh hại thanh long quan trọng nhất (Lan và cs., 2012; Chuang và cs., 2012). Bệnh thường tấn công vào các bộ phận còn non của cây như dây, quả non. Ban đầu vết bệnh là những hình tròn nhỏ li ti, bị lõm vào, sau đó các vết bệnh chuyển thành màu trắng, rồi màu vàng chanh, ở giữa vết bệnh có chấm nâu tròn hơi nổi lên. Khi bệnh nặng, nhiều vết bệnh liên kết với nhau thành mảng lớn gây thối dây và trái, ảnh hưởng tới năng suất, chất lượng trái, đặc biệt là làm trái bị mất thẩm mỹ, mất giá và không thể xuất khẩu. Nấm *Neoscytalidium dimidiatum* được ghi nhận là tác nhân gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long (Lan và cs., 2012; Chuang và cs., 2012). Hiện nay, Cục Bảo vệ thực vật khuyến cáo áp dụng các biện pháp quản lý dịch hại tổng hợp để phòng trừ bệnh đốm nâu như trồng giống sạch bệnh, cắt tỉa thu gom cành bị bệnh, xử lý sinh học và hóa học. Các hóa chất chủ yếu sử dụng có chứa đồng, phosphorous acid, azoxystrobin, hexaconazole có thể kiểm soát bệnh với mức độ hiệu quả khác nhau (Hiếu và cs., 2018). Vì vậy, việc tìm kiếm một biện pháp mới để tăng sức đề kháng cho cây thanh long là cần thiết. Cây trồng luôn có một hệ thống miễn dịch chống lại các yếu tố bất lợi của môi trường. Elicitor là các hợp chất sinh học hoặc phi sinh học kích hoạt cơ chế bảo vệ

và khả năng miễn dịch bẩm sinh ở thực vật chống lại mầm bệnh. Các elicitor có thể là hóa chất, vi sinh vật, chiết xuất thực vật, động vật như chitosan, salicylic axit (Du và cs., 2015; Tuan và cs., 2019).

Trong những năm gần đây, công nghệ nano đã được ứng dụng vào nhiều lĩnh vực trong nông nghiệp như phân bón nano, vật liệu nano, thuốc trừ sâu nano nhằm tăng cường khả năng sức đề kháng của cây trồng, nâng cao năng suất và chất lượng, đặc biệt là xây dựng nền nông nghiệp bền vững (Uyen và Hai, 2018; Du và cs., 2019; Tuan và cs., 2019). Các hạt nano được sử dụng làm hoạt chất kháng vi sinh vật (bạc, vàng, đồng, titan dioxide và silica) hoặc chất mang (chitosan, alginate) của các hợp chất bảo vệ thực vật như chất diệt nấm để chống lại vi khuẩn, nấm, vi rút và côn trùng (Du, 2009; Uyen và Hai, 2018; Tuan và cs., 2019). Việc áp dụng các hạt nano làm thuốc trừ bệnh trong nông nghiệp có những lợi thế như cải thiện khả năng hấp thu, tăng khả năng hòa tan, giảm rửa trôi đất và giảm độc tính (Worrall và cs., 2018). Trong nhiều đánh giá gần đây, công nghệ hạt nano được coi là một kỹ thuật an toàn sinh học, tuy nhiên các hạt nano có thể có tác động tiêu cực đến các cộng đồng vi sinh vật trong đất ở mức độ thấp khi so sánh với việc áp dụng hóa chất. Chitosan (CS) là một polysaccharit tự nhiên có các đặc tính ưu việt, bao gồm độc tính thấp, khả năng phân hủy sinh học, tương thích sinh học, không độc hại với môi trường đã được áp dụng trong sản xuất cây trồng để quản lý dịch bệnh và nâng cao năng suất cây trồng (Malerba và cs., 2019; Chakraborty và cs., 2020). Hiệu lực kháng vi sinh vật phổ rộng của CS đã được ghi nhận khi chúng chống lại các

loài vi nấm, vi khuẩn gây bệnh khác nhau như *Fusarium solani*, *Phytophthora infestance*, *Botryties cienerte a*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas* và *Erwinia carotovora* (El-Mohamedya và cs., 2019). Nồng độ ức chế sinh trưởng vi sinh vật tối thiểu của CS trong khoảng từ 10 đến 5.000 ppm tùy thuộc vào khối lượng phân tử và độ ðe acetyl (El Hadrami và cs., 2010). Hơn nữa, hoạt tính kháng nấm của CS cũng ðược chứng minh qua các thí nghiệm *in vivo* gây bệnh trên các loài thực vật, chẳng hạn như CS kháng nấm *A. kikuchiana* và *Physalophora piricola* trên cây lê (Meng và cs., 2010), kháng nấm *C. gleosporoides* trên thanh long (Zahid và cs., 2015) và kháng nấm *R. solani* trên lúa (Liu và cs., 2012). Hơn nữa, CS có khối lượng phân tử thấp hoạt ðộng như một chất kích kháng sinh học, nó kích hoạt tạo ra kháng thể như chitinase, glucanase từ các phản ứng phản vệ thực vật làm gia tăng sức ðe kháng của cây trồng ðối với mầm bệnh xâm nhập (Yin và cs., 2010; Du và cs., 2015; Tuan và cs., 2019). Salicylic axit (SA) một loại hormone thực vật ðóng nhiều vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, nó có thể hoạt ðộng như một “tác nhân ðiều trị bệnh” (Koo và cs., 2020). Sự tổng hợp và tích lũy SA là một phần của phản ứng phòng vệ của thực vật chống lại sự tấn công của mầm bệnh (Sharma và cs., 2020). Một số nghiên cứu cũng ðã chứng minh rằng salicylic axit/chitosan (SA/CS) composit có tác ðụng kháng khuẩn và kích thích tăng trưởng vượt trội so với SA hoặc CS ðơn lẻ. Thí nghiệm ðo Morovvat và cs. (2021) thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của việc bón lá CS và SA lên năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất

khoai tây trong ðiều kiện khô hạn. Kết quả cho thấy năng suất ðược tăng lên khi sử ðụng SA/CS so với CS hoặc SA ðơn lẻ. SA chứa nano CS ở nồng ðộ 0,01 - 0,16% có thể ức chế sự phát triển của sợi nấm *Fusarium verticillioides* từ 62,2 - 100% và sự nảy mầm của bào tử từ 48,3 - 60,5% trong ðiều kiện *in vitro*. Ngoài ra, nó hoạt ðộng như một chất kích hoạt hệ thống phòng thủ của cây ngô ðể giảm bệnh thối thân sau khi ra hoa từ 40,5 ðến 59,47% và tăng năng suất gấp 1,3 - 1,5 lần so với ðối chứng trong ðiều kiện ðồng ruộng (Kumaraswamy và cs., 2019). Bên cạnh ðó, Molamohammadi và cs. (2019) ðã báo cáo rằng màng phủ SA/CS duy trì chất lượng hạt ðe cùoi sau thu hoạch.

Có hai cách tiếp cận ðể tổng hợp các hạt nano bao gồm phương pháp từ trên xuống và từ ðưới lên nên ảnh hưởng ðến kích thước, hình dạng và chức năng khác nhau của chúng. Một số hạt nano tổng hợp ðược sử ðụng làm thuốc trừ bệnh bằng kỹ thuật sol-gel, tổng hợp xanh bởi vi sinh vật hoặc dịch chiết thực vật (Singh và cs., 2018). ðã có một vài nghiên cứu phòng trừ bệnh ðốm nâu thanh long bằng các hoạt chất trừ nấm hiện có trên thị trường nhưng việc áp ðụng nano chitosan/salicylic axit ðể phòng trừ bệnh ðốm nâu hại thanh long là chưa có. Hơn nữa trong nghiên cứu này, chế phẩm nano SA ổn ðịnh trong CS khối lượng phân tử trung bình ðược ðiều chế bằng kỹ thuật sol-gel là ðễ ðàng và thân thiện với môi trường (Pedroso-Santana và cs., 2020). Hiệu lực sinh học của chúng thể hiện là chất kích kháng nano ðể kiểm soát bệnh ðốm nâu hại thanh long ðã ðược ðánh giá trong ðiều kiện nhà lưới.

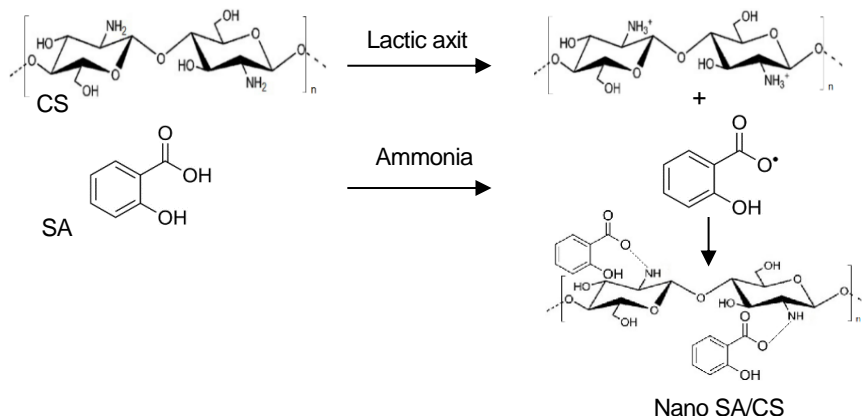
2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chitosan (khối lượng phân tử 80.020 g/mol, độ ðề acetyl là 93,14% và độ ẩm 9,9% (w/w)) ðược cung cấp bởi Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng (Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam). Salicylic axit và NH₄OH thuộc loại ACS (> 99%) của Merck (Đức). Lactic axit, HCl, NaOH của Xilong (Trung Quốc). Môi trường Potato Dextrose Broth (PDB) của Himedia (Ấn Độ). Nấm *Neoscytalidium dimidiatum* ðược cung cấp bởi Bộ môn Bảo vệ thực vật - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam.

2.2. Chuẩn bị chế phẩm nano chitosan/salicylic axit

Chế phẩm nano chitosan/salicylic axit



Hình 1. Mô phỏng quá trình chuẩn bị chế phẩm nano SA/CS

Xác ðịnh ðặc tính của nano SA/CS như sau: khối lượng phân tử của CS ðo bằng sắc ký lọc gel (GPC) trên thiết bị GPC LC-20AD-Shimadzu (Nhật Bản), kích thước hạt SA ðược xác ðịnh bằng ảnh chụp kính hiển vi ðiện tử truyền qua (TEM) trên máy TEM S4800-NIHE (Nhật Bản), dự ðoán liên kết giữa CS và SA bằng phổ hồng ngoại biến ðổi Fourier

(nSA/CS) có hàm lượng CS 5% (w/v) và SA 0,5% (w/v) ðược chuẩn bị theo nghiên cứu trước của chúng tôi (Tuấn và cs., 2022). Trước tiên, lấy 11 g CS hòa tan trong 150 mL dung dịch lactic axit (2%, v/v) ðựng trong cốc 250 mL trên máy khuấy từ ở nhiệt ðộ phòng. Chuẩn bị một cốc khác, lấy 1 g SA phản ứng với 0,26 g NH₄OH trong 40 ml nước cất thu ðược dung dịch muối amoni salicylate. Tiếp theo, cho từ từ dung dịch muối amoni salicylate vào dung dịch CS ðã chuẩn bị ở trên, vừa cho vừa khuấy ở tốc ðộ cao (500 v/p) ðể hình thành các hạt SA và liên kết ion giữa nhóm amin của CS và nhóm cacboxyl của SA bởi phản ứng sol-gel (hình 1). Nước cất ðược thêm cho ðủ 200 mL và kết thúc phản ứng.

(FT-IR) ðo trên quang phổ kế FT-IR 8400S-Shimadzu, Nhật Bản.

2.3. Nghiên cứu *in vivo* kiểm soát bệnh ðốm nâu thanh long bởi nano SA/CS trong ðiều kiện nhà lưới

Thí nghiệm ðược bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với ba lần lặp lại tại Khu nhà lưới của Viện Khoa học Kỹ thuật

Nông nghiệp miền Nam vào tháng 4/2023 trên giống thanh long ruột đỏ 6 tháng tuổi theo TCVN 12561:2022 và TCVN 13268-4:2021. Dây thanh long được trồng trong chậu nhựa (đường kính 30 cm), mỗi chậu thanh long được bón phân hữu cơ vi sinh với liều lượng 200 g/chậu và phân NPK 20-20-15 với liều lượng 20 g/chậu, định kỳ 15 ngày bón 1 lần. Thí nghiệm được bố trí 5 nghiệm thức gồm 3 nghiệm thức nano SA/CS với nồng độ hoạt chất lần lượt là 330 ppm (300 ppm CS/30 ppm SA), 440 ppm (400 ppm CS/40 ppm SA) và 550 ppm (500 ppm CS/50 ppm SA); 1 đối chứng dương (Mancozeb 0,5%) và 1 đối chứng âm (phun nước lã). Mỗi nghiệm thức bố trí 3 chậu. Tiến hành thí nghiệm như sau: phun các nghiệm thức 2 lần cách nhau 3 ngày, mỗi chậu phun khoảng 200 ml dung dịch sau pha chế. Sau 2 ngày phun mẫu thí nghiệm tiến hành phun gây nhiễm bệnh đốm nâu trên cây thanh long bởi 200 ml/chậu dịch huyền phù nấm *N. dimidiatum* (mật độ 10^6 CFU/mL) lên dây thanh long. Điều tra bệnh sau phun gây nhiễm bệnh 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày. Mỗi nghiệm thức theo dõi 3 chậu. Trên mỗi chậu theo dõi 2 cành cố định, mỗi cành theo dõi một đoạn cành dài 30 cm (được tính từ đỉnh cành trở vào). Quan sát và phân cấp mức độ bệnh ở cả 3 mặt của đoạn cành. Chỉ số bệnh được tính theo công thức Townsend-Heuberger: chỉ số bệnh (%) = $100 \times ((9n_9 + 7n_7 + 5n_5 + 3n_3 + n_1)/9N)$, trong đó: N tổng số cành điều tra, n_1 là số đoạn cành bị bệnh < 1% diện tích; n_3 là số đoạn cành bị bệnh < 10% diện tích; n_5 là số đoạn cành bị bệnh < 25%

diện tích; n_7 là số đoạn cành bị bệnh < 50% diện tích; n_9 là số đoạn cành bị bệnh $\geq 50\%$ diện tích. Hiệu lực được tính theo công thức Abbott: Hiệu lực (%) = $[1 - (Ta/Ca)] \times 100$, trong đó: Ta là chỉ số bệnh ở nghiệm thức xử lý thuốc sau phun; Ca là chỉ số bệnh ở nghiệm thức đối chứng sau phun.

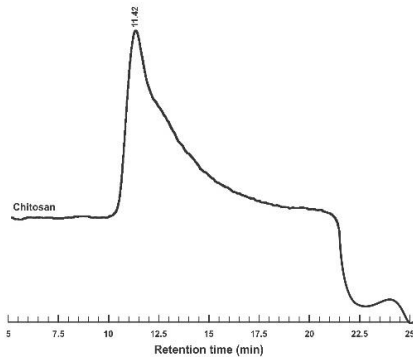
2.4. Phân tích thống kê

Kích thước hạt nano SA/CS được xác định thống kê từ ảnh TEM bằng phần mềm MS Excel 2013 và phần mềm IRRISTAT 5.0 để so sánh sự sai khác có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình của các số liệu thực nghiệm. Tất cả dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm sai số chuẩn (SE).

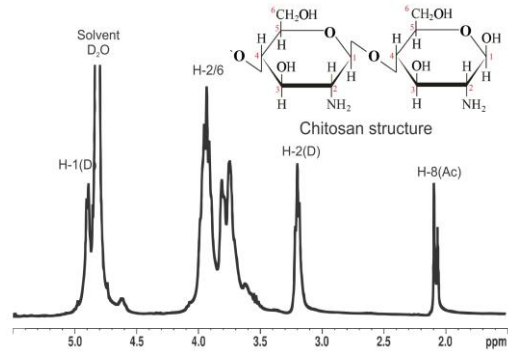
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc tính của chế phẩm nano SA/CS

Phổ sắc ký thẩm thấu gel (GPC) của CS thể hiện trên hình 2a, kết quả xác định khối lượng phân tử (Mw), khối lượng phân tử số (Mn) và chỉ số phân tán polyme (PI = Mw/Mn) của CS lần lượt là 80.020 g/mol, 55.180 g/mol và 1,45. Đặc điểm của các nhóm chức và độ đẽ acetyl (DDA) của CS được xác định thông qua phổ ^1H - NMR trong hình 2b. DDA tính theo công thức của Lavertu và cs (2003): $\text{DDA} (\%) = (1 - 1/3\text{H}_{\text{Ac}}:1/6\text{H}_{26}) \times 100 = (1 - 1/3 \times 0,21:1/6 \times 6,12) = 93,14\%$. Trong đó: H_{26} : tích phân tín hiệu của proton từ đỉnh H2 đến H6 (6.12); H_{Ac} là tổng tích phân tín hiệu của các proton của nhóm acetyl (0,21).



Hình 2a. Phổ GPC của chitosan



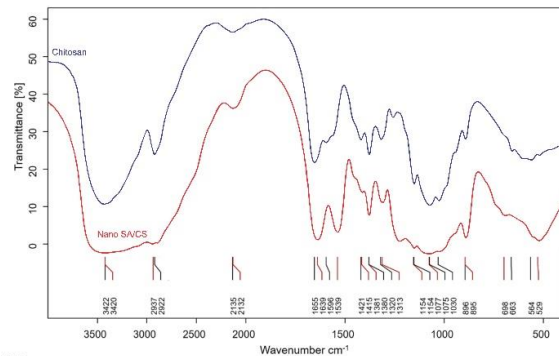
Hình 2b. Phổ ¹H - NMR của chitosan

Dung dịch nano SA/CS có màu nâu xám, so với màu vàng óng của CS ban đầu thì sau quá trình sol-gel hình thành các hạt

nano SA ổn định trong CS khối lượng phân tử 80.020 g/mol thì màu của chế phẩm nano SA/CS thay đổi rõ rệt (hình 3).



Hình 3. Sự thay đổi màu sắc của dung dịch trong điều chế nano SA/CS



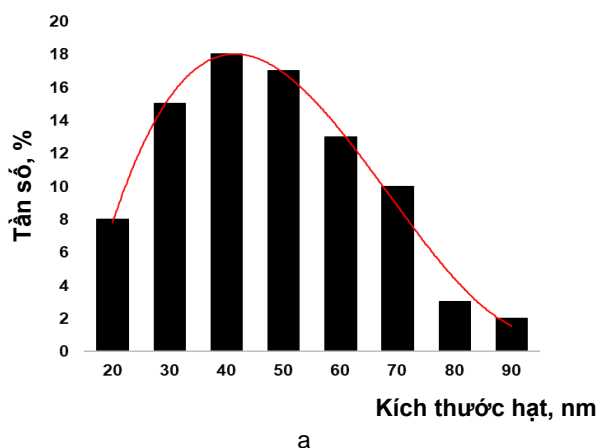
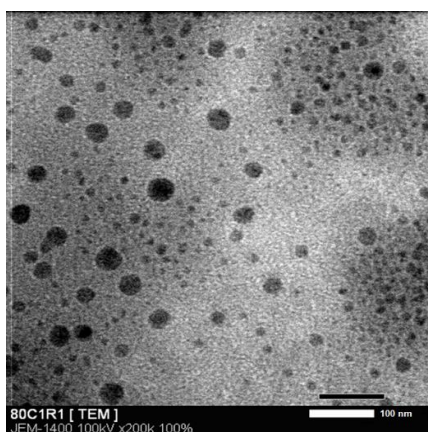
Hình 4. Phổ FT-IR của chitosan và nano SA/CS

Phổ FT-IR của CS và nano SA/CS thể hiện trong hình 4. Dữ liệu phổ của CS (hình 4a) như sau: ở vị trí số sóng 3.422 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của nhóm -OH và NH₂ kéo dài, ở vị trí số sóng 2.937 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của nhóm -CH, ở vị trí 1.655 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của nhóm OC-NH₂ uốn, ở vị trí 1.030 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động của nhóm C-O-C, ở vị trí số sóng 1.596 cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết C=O của cầu nối oxy do khử nhóm acetyl của vòng glucosamin và vị trí 561 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động kéo vòng pyranoside. Dữ liệu phổ của nano SA/CS (hình 4b), báo cáo rằng đỉnh 3.420 cm⁻¹ rộng hơn,

điều này cho thấy liên kết hydro đã được tăng cường giữa sự bẻ cong của nhóm -OH của CS (Kumaraswamy và cs., 2019). Dao động uốn -NH₂ thay đổi từ vị trí 1.655 - 1.639 cm⁻¹ và một đỉnh mới ở vị trí 1.539 cm⁻¹ cho thấy rằng có một số tương tác giữa các nhóm NH₃⁺ của CS và SA xảy ra trong chế phẩm nano SA/CS. Đỉnh ở vị trí 1.313 cm⁻¹ cho thấy sự uốn cong nhóm C-N do tương tác giữa nhóm cacboxylic (-COOH) của SA và nhóm amin (-NH₂) của CS. Điều này minh chứng rằng liên kết ion được hình thành giữa nhóm cacboxyl của SA và nhóm amin của CS (Nasonova và cs., 2020) làm cho vị trí số sóng có sự dịch chuyển

về vị trí cao hơn trong phổ FT-IR của nano SA/CS. Kết quả có thể chỉ ra rằng

nano SA đã được gắn kết thành công vào phân tử CS.



Hình 5. Ảnh TEM (A) và phân bố kích thước hạt (a) của nano SA/CS

Hình thái và kích thước hạt của chế phẩm nano SA/CS xác định qua ảnh TEM. Hình 5 cho thấy rằng hạt nano SA có hình cầu, kích thước hạt trung bình là 40 ± 15 nm, phân bố trong phạm vi từ 20 - 90 nm. Trong nghiên cứu của Kumaraswamy và cs. (2019), kích thước hạt nano SA/CS là 386 nm, kích thước này khá lớn vì tác giả đã xác định cả kích thước của 02 phân tử SA và cs., còn trong nghiên cứu này chúng tôi xác định kích thước hạt qua ảnh TEM có độ phân giải

cao nên quan sát được kích thước nano của SA.

3.2. Hiệu lực của chế phẩm nano SA/CS đối với bệnh đốm nâu trong điều kiện nhà lưới

Số liệu ở bảng 1 trình bày chỉ số bệnh và hiệu lực của chế phẩm nano SA/CS trong việc kiểm soát bệnh đốm nâu thanh long ở điều kiện thí nghiệm trong nhà lưới.

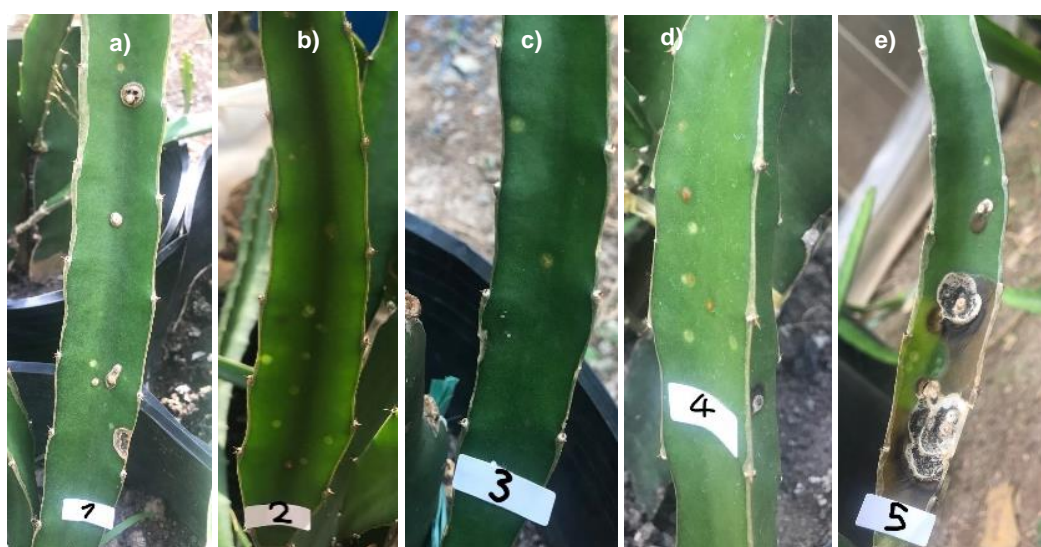
Bảng 1. Chỉ số bệnh và hiệu lực kích kháng bệnh đốm nâu thanh long của nano SA/CS

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh đốm nâu (%)			Hiệu lực (%)		
	7 NSGN	14 NSGN	21 NSGN	7 NSGN	14 NSGN	21 NSGN
nano SA/CS 330 mg/L (NT1)	11,73 ± 2,83 ^b	20,99 ± 4,28 ^b	16,05 ± 5,66 ^b	32,14	34,62	56,67
nano SA/CS 440 mg/L (NT2)	11,11 ± 3,70 ^b	14,81 ± 5,35 ^d	10,49 ± 2,83 ^c	35,71	53,85	71,67
nano SA/CS 550 mg/L (NT3)	9,26 ± 1,85 ^c	8,64 ± 3,21 ^e	6,17 ± 1,07 ^d	46,43	73,08	83,33
Mancozeb 0,5% (NT4)	8,64 ± 1,07 ^c	17,28 ± 3,85 ^c	19,14 ± 3,85 ^b	50,00	46,15	48,33
Đối chứng (NT5)	17,28 ± 2,14 ^a	32,10 ± 6,42 ^a	37,04 ± 6,42 ^a	-	-	-
LSD _{0,05}	1,52	2,17	3,18			
CV (%)	16,76	17,75	17,89			

Ghi chú: NSGN là ngày sau gây nhiễm; trong cùng một cột, các chữ cái theo sau khác nhau thì có khác biệt về mặt thống kê ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ theo phân tích ANOVA một chiều và Duncan's Multiple Range Test (DMRT); LSD: khác biệt tối thiểu có ý nghĩa thống kê.

Bảng 1 cho thấy chỉ số bệnh của các nghiệm thức thí nghiệm được xử lý bằng nano SA/CS thấp hơn và có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức xử lý Mancozeb và đối chứng tại thời điểm 14 và 21 ngày sau gây nhiễm (NSGN). Ở các mẫu thí nghiệm, chỉ số bệnh giảm khi nồng độ hoạt chất tăng. Cụ thể, tại thời điểm 14 NSGN chỉ số bệnh của nghiệm thức thí nghiệm xử lý nano SA/CS có nồng độ tăng từ 330 ppm lên 550 ppm thì chỉ số

bệnh giảm từ 20,99% xuống còn 8,46%, trong khi đó mẫu đối chứng âm có chỉ số bệnh cao nhất là 32,10%. Tại thời điểm 21 NSGN, chỉ số bệnh của mẫu xử lý nano SA/CS 550 ppm là 6,17% đạt hiệu lực kiểm soát bệnh đốm nâu là 83,33%, kết quả này cao hơn 02 nghiệm thức còn lại xử lý bởi nano SA/CS 440 ppm và 330 ppm tương ứng với hiệu lực là 71,67% và 56,67%, điều này cũng được thể hiện qua triệu chứng vết bệnh trong hình.



Hình 2. Vết bệnh đốm nâu trên dây thanh long trong thí nghiệm tại thời điểm 21 ngày sau gây nhiễm

(a: nano SA/CS 330 ppm; b: nano SA/CS 440 ppm; c: nano SA/CS 550 ppm; d: Mancozeb và e: đối chứng)

Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận ở mẫu đối chứng dương xử lý Mancozeb 0,5% thì hiệu lực kiểm soát bệnh đốm nâu thanh long ở các thời điểm theo dõi không thấy có sự khác biệt lớn, dao động từ 46,15 - 50%. Điều này có thể giải thích rằng, thí nghiệm này được bố trí với mục đích đánh giá khả năng kích kháng hơn là khả năng trừ bệnh của chế phẩm nano SA/CS, với hoạt tính trừ nấm của

Mancozeb thì hiệu lực sẽ thể hiện ngay sau khi gây nhiễm nấm chứ không duy trì khả năng kích kháng bệnh của cây trồng. Trước đây cũng có một vài nghiên cứu về hiệu ứng kích kháng bệnh đốm nâu thanh long như của Du và cs. (2015) cho thấy oligochitosan ở nồng độ 150 ppm có hiệu ứng kích thích sản sinh enzyme chitinase tấn công lại nấm *N. dimidiatum* xâm nhập gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long.

Cũng bằng phương pháp nghiên cứu tương tự, tác giả Tuan và cs. (2019) đã công bố hoạt chất nano SiO₂/oligochitosan có hiệu ứng đồng vận giữa nano silica và oligochitosan kích hoạt gen phòng thủ của tế bào thực vật sản sinh ra enzyme chitinase chống lại sự xâm nhập của nấm *N. dimidiatum*.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chế phẩm nano SA/C được chuẩn bị bằng kỹ thuật sol-gel giữa muối salicylate và CS khối lượng phân tử 80,020 g/mol với độ đề acetyl 93,14% để hình thành các hạt SA có đường kính trung bình là 40 ± 15 nm. Các hạt nano salicylic axit có dạng hình cầu và phân bố trong phạm vi nhỏ hơn 100 nm. Các kết quả xác định đặc tính cho thấy nhóm cacboxyl của SA liên kết ion với nhóm amin của CS. Hiệu lực *in vivo* cho thấy nano SA/CS kiểm soát bệnh đốm nâu trên cây thanh long đạt 83,33% ở nồng độ hoạt chất 550 ppm (50 ppm SA/500 ppm CS). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng nano SA/CS có thể ứng dụng là hoạt chất diệt nấm đầy tiềm năng và cần có thêm nghiên cứu để kiểm soát bệnh đốm nâu thanh long trên đồng ruộng.

Lời cảm ơn: nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Trà Vinh qua đề tài có mã số “CT.NN.07 - 2021”

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Duy Du, 2009. Nghiên cứu chế tạo keo bạc nano bằng bức xạ gamma Co-60 và một số ứng dụng của chúng trong y học và nông nghiệp, Luận án tiến sĩ Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. Chakraborty M., Hasanuzzaman M., Rahman M., Khan M. và cs., 2020. Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer, *Agriculture*, 10, 624.
3. Chuang M.F., Ni H.F., Yang H.R., Shu S.L., Lai S.Y., Jiang Y.L., 2012. First report of stem canker disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease*, 96, 906.
4. Du B.D., Dung L.T.K., Khoa V.N.D., Thang N.D., Tuan L.N.A., 2015. Chitinase-induced resistance against *neoscytalidium dimidiatum* on dragon trees: the effect of oligochitosan prepared by the heterogeneous degradation of chitosan with H₂O₂ under hydrothermal conditions, *Vietnam Journal of Chemistry*, 53(2) 161 - 165.
5. Du B.D., Ngọc D.T.B., Thang N.D., Tuan L.N.A., Thạch B.D., Hien N.Q., 2019. Synthesis and *in vitro* antifungal efficiency of alginate-stabilized Cu₂O-Cu nanoparticles against *Neoscytalidium dimidiatum* causing brown spot disease on dragon fruit plants (*Hylocereus undatus*), *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(3), 318.
6. Đặng Thị Kim Uyên, 2022. Nghiên cứu bệnh thán thư trên thanh long và biện pháp quản lý tổng hợp, Luận án tiến sĩ Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Cần Thơ.
7. El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., and Daayf F., 2010. Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*, 8(4), 968 - 987.
8. El-Mohamedya R. S. R., Abd El - Aziz M. E., and Kamel S., 2019. Antifungal activity of chitosan nanoparticles against some plant pathogenic fungi *in vitro*, *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 21(4): 201 - 209.
9. Koo Y.M., Heo A.Y., and Choi H.W., 2020. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator, *The Plant Pathology Journal*, 36 (1), 1 - 10.
10. Kumaraswamy R.V., Kumari S., Choudhary R. C., Sharma S.S. và cs., 2019. Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A

- sustainable biostimulant for plant, *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 59 - 69.
11. Lan G.B., He Z. - F., Xi P.G., and Jiang Z.D., 2012. First report of brown spot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese Mainland, *Plant disease*, 96(11), 1702.
 12. Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues và cs., 2003. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32, 1149 - 1158.
 13. Liu H., Tian W.X., Li B., Wu G.X., Ibrahim M., Tao Z.Y., Wang Y.L. và cs., 2012. Antifungal effect and mechanism of chitosan against the rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. *Biotechnology Letters*, 34, 2291 - 2298.
 14. Malerba M., Cerana R., 2019. Recent applications of chitin - and chitosan - based polymers in plants, *Polymers*, 11, 839.
 15. Meng X.H., Yang L.Y., Kennedy J.F. and Tian S.P., 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit, *Carbohydrate Polymers*, 81, 70 - 75.
 16. Molamohammadi H., Pakkish Z., Akhavan H.-R., and Saffari V. R., 2019. Effect of salicylic acid incorporated chitosan coating on shelf life extension of fresh in-hull pistachio fruit. *Food and Bioprocess Technology*, 13(1), 121 - 131.
 17. Morovvat S.A., Sadrabadi R., Noferest K.S., Darban A.S., and Salati M., 2021. Effects of foliar application chitosan and salicylic acid on physiological characteristics and yield under deficit irrigation condition. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 43(1), 101 - 113.
 18. Nasonova A., Cohen Y., Poverenov E., and Borisover M., 2020. Binding interactions of salicylic acid with chitosan and its N-alkylated derivative in solutions: An equilibrium dialysis study, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 603, 125202.
 19. Nguyễn Thành Hiếu, Nguyễn Hồng Sơn, Nguyễn Thị Bích Ngọc và cs., 2018. Quy trình phòng trừ tổng hợp bệnh đốm nâu (*Neoscytalidium dimidiatum*) thanh long.
 20. Nguyen N. T., 2020. Strategic Marketing for the Vietnamese Dragon Fruit. *Archives of Business Research*, 8(5), 211 - 226.
 21. Pedroso-Santana S., Fleitas-Salazar N., 2020. Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*, 69, 443 - 447.
 22. Sharma S., Gupta N., 2020. Defense signaling in plants against micro - creatures: do or die. *Indian Phytopathology* 73, 605 - 613.
 23. Singh J., Dutta T., Kim K.H., Rawat M., Samddar P., Kumar P., 2018. 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 1 - 24.
 24. Tuan L.N.A., Du B.D., Ha L.D.T., Dung L.T.K., Phu D.V., Hien N.Q. (2019). Induction of chitinase and brown spot disease resistance by oligochitosan and nanosilica - oligochitosan in dragon fruit plants. *Agricultural Research*, 8, 184 - 190.
 25. Uyen T.P.N. and Hai N.D., 2018. Synergistic antifungal effect of fungicide and chitosan-silver nanoparticles on *Neoscytalidium dimidiatum*, *Green Processing and Synthesis*, 7(2), 132 - 138.
 26. Worrall E.A., Hamid A., Mody K.T., Mitter N., Pappu H.R., 2018. Nanotechnology for plant disease management. *Agronomy* 8, 285.
 27. Yin H., Zhao X. and Du Y., 2010. Oligochitosan: A plant diseases vaccine-A review. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1 - 8.
 28. Zahid N., Maqbool M., Siddiqui Y., Manickam S. and Ali A., 2015. Regulation of inducible enzymes and suppression of anthracnose using submicron chitosan dispersions. *Scientia Horticulturae*, 193, 381 - 388.

ABSTRACT

Synthesis and evaluation of the efficacy of nano chitosan/salicylic acid against brown spot disease of dragon fruit plant (*Neoscytalidium dimidiatum*) under greenhouse conditions

*Brown spot disease of dragon fruit plants (*Neoscytalidium dimidiatum*) is one of the most dangerous and common diseases. Nanotechnology used to control plant diseases and improve plant growth. In this study, we present the preparation of salicylic acid (SA) nanoparticles stabilized by medium molecular weight chitosan (CS) - Mw 80,020 g/mol by the sol-gel technology. Characterization of nano SA/CS and their efficacy against brown spot disease on dragon fruit plants were studied. The SA/CS nanomaterials (CS 5%/SA 0.5%) had diluted to concentrations of 330 ppm (300 ppm CS/30 ppm SA), 440 ppm (400 ppm CS/40 ppm SA) and 550 ppm (500 ppm CS/50 ppm SA) to study. The results showed that the above 03 treatments were not toxic to dragon fruit plants using up to 550 ppm nano SA/CS concentration. The treatment of nano SA/CS 550 ppm (NT3) showed that the control effect of brown spot disease on dragon fruit was higher than that of the other treatments in reducing the disease severity of brown spot disease. Furthermore, NT3 had an efficacy of up to 83.33% compared to the negative control (NT5) in greenhouses treatment. The study shows the potential of using nano SA/CS as a resistance promoter to manage brown spot disease on dragon fruit.*

Keywords: *salicylic acid/chitosan nanoparticles, brown spot disease, dragon fruit plant.*

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN TỔ HỢP GHEP HỒ TIÊU CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *Phytophthora capsici* GÂY BỆNH CHẾT NHANH

Dương Thị Oanh^{1*}, Trần Thị Diệu Hiền¹,
Nguyễn Quang Ngọc¹, Phạm Thị Hoài¹, Nguyễn Bá Huy¹

¹Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển cây hồ tiêu,
Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI)

* E-mail liên hệ: oanhhtgl@yahoo.com.vn

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu thử nghiệm các tổ hợp ghép hồ tiêu về khả năng kháng *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh trên cây hồ tiêu trong nhà màng cho thấy: Tổ hợp tiêu ghép VL-TRNM kháng nấm, cây không bị thối rễ và chết cây sau 60 ngày lây nhiễm. Tổ hợp tiêu ghép VL-L1 có khả năng chống chịu tốt với *P. capsici*, tỷ lệ cây chết thấp (13,33%).

Từ khóa: hồ tiêu, tổ hợp ghép, *Phytophthora capsici*, kháng bệnh.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là quốc gia dẫn đầu thế giới về sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu, tổng diện tích trồng hồ tiêu cả nước khoảng 130 nghìn ha và sản lượng 175.000 tấn (VPA, 2022), tập trung tại 2 vùng trồng chính là Tây Nguyên và Đông Nam Bộ. Tuy nhiên, ngành hồ tiêu của Việt Nam đã và đang phải đối mặt với nhiều khó khăn và thách thức, trong đó bệnh chết nhanh do *Phytophthora capsici* gây hại hàng loạt diện tích hồ tiêu, năm 2016 tổng diện tích bị hại của các tỉnh trồng tiêu là 868 ha; năm 2018 tại tỉnh Đắk Lắk 1.058 ha, Đắk Nông 1.026 ha, Gia Lai 5.547 ha; năm 2022 tại các tỉnh Tây Nguyên là 90,2 ha (Cục Bảo vệ thực vật,

2016, 2019, 2022). Biện pháp phòng trừ bằng canh tác và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hiệu quả không cao và tồn dư hóa chất trong sản phẩm. Bên cạnh đó, các giống hồ tiêu đang trồng phổ biến như Vĩnh Linh, Lộc Ninh, Ấn Độ... chưa có giống nào kháng được nấm *Phytophthora* spp. Chọn giống hồ tiêu kháng nấm *Phytophthora* spp. đang là hướng đi được các nước trồng tiêu trên thế giới và Việt Nam quan tâm. Sử dụng các giống tiêu Kuching năng suất cao ghép trên gốc *Piper colubrinum* để kiểm soát bệnh thối gốc (Kueh & Kuthubutheen, 1990). Tại Việt Nam, 2 loài tiêu rừng Nam Mỹ (*Piper colubrinum*) và trầu không (*Piper betle*) đã được xác định là có khả năng kháng và chống chịu với *P. capsici* (Nguyễn Trần Quyên và cs., 2020; Trần

Người phân biên: ThS. Đào Thị Lan Hoa

Thị Diệu Hiền và cs., 2019). Chính vì vậy, cần tuyển chọn các loài cây làm gốc ghép và đánh giá tính kháng *P. capsici* của các tổ hợp cây tiêu ghép để chọn được giống kháng hoặc chống chịu bệnh là hết sức cần thiết trong giai đoạn hiện nay.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- **Vật liệu giống:** cây gốc ghép và ngọn ghép được thu thập tại vườn tập đoàn giống hồ tiêu. Ngọn ghép: sử dụng hom tiêu lươn bánh tẻ của giống tiêu Vĩnh Linh (VL). Cây gốc ghép cùng loài hồ tiêu (*Piper nigrum*): tiêu địa phương (L1), tiêu đọt xanh địa phương (V19), tiêu mọc từ hạt Vĩnh Linh (V21).

Cây gốc ghép khác loài hồ tiêu: trâu không - *Piper betle* (TrN), tiêu rừng Nam Mỹ - *Piper colubrinum* (TRNM). Đặc điểm của cây làm gốc ghép là sinh trưởng khỏe.

Tổ hợp ghép (ngọn ghép - gốc ghép): VL-L1; VL-V19; VL-V21; VL-TrN; VL-TRNM. Cây ghép được trồng trong chậu nhựa (cao × rộng: 27 × 14 cm) chứa giá thể gồm đất, phân chuồng hoai mục (tỉ lệ 3:1) đã xử lý ở nhiệt độ 121°C trong 30 phút. Mỗi chậu trồng 01 cây, dưới đáy chậu có lót đĩa nhựa để hạn chế tiếp xúc với mặt đất. Tiêu chuẩn cây ghép khi đưa vào thí nghiệm, cao cây từ 25 - 30 cm, có 5 - 6 lá thật.

- Nguồn bệnh: *P. capsici* được phân lập từ đất trồng hồ tiêu bị nhiễm bệnh chết nhanh tại Tây Nguyên. Giải trình tự AND,

định danh xác định loài tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa. Nhân và tạo động bào tử tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển cây hồ tiêu, WASI.

- Địa điểm nghiên cứu: thí nghiệm thực hiện trong nhà lưới cách ly tốt với môi trường bên ngoài, tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển cây hồ tiêu, tỉnh Gia Lai.

- Thời gian thực hiện: tháng 01 - 12/2021

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 3 lần lặp lại, 5 tổ hợp ghép, gồm: VL-L1, VL-V19, VL-V21, VL-TrN, VL-TRNM được chủng nấm *P. capsici*. Mỗi ô cơ sở 10 cây hồ tiêu trồng trong chậu nhựa.

Phương pháp lây nhiễm nhân tạo nấm *P. capsici*: nấm được cấy thuần trên đĩa petri (đường kính 9 cm) chứa môi trường PCA, sau 7 ngày quan sát sự hình thành túi bào tử nấm trên kính hiển vi. Cho 20 mL nước cất đã khử trùng vào đĩa nấm để ở nhiệt độ phòng có chiếu sáng trong 2 ngày để kích thích hình thành túi bào tử, sau 2 ngày để đĩa nấm ở nhiệt độ 4 - 5°C trong 2 - 3 giờ sau đó thu dung dịch bào tử động, nồng độ thử nghiệm là 10⁴ CFU bào tử/mL. Tưới 50 mL/chậu dung dịch chứa bào tử động *P. capsici*.

Chỉ tiêu theo dõi: theo dõi tại thời điểm 60 ngày sau lây nhiễm.

Tỉ lệ cây chết (%): quan sát cây chết do nấm *P. capsici* trên tất cả các chậu thí nghiệm.

$$\text{Tỉ lệ cây chết (\%)} = \frac{(\text{Số cây chết})}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

Tần suất xuất hiện nấm *P. capsici* trong đất (%): đánh giá sự xuất hiện của nấm *Phytophthora* trong đất theo phương pháp bẫy cánh hoa hồng (Erwin & Ribeiro, 1996).

Tỉ lệ rễ thối (%): đếm số rễ chính bị thối của cây, rửa sạch rễ dưới vòi nước, quan sát và đếm rễ bị thối, chuyển màu nâu đen.

$$\text{Tỉ lệ rễ thối (\%)} = \frac{(\text{Số rễ chính bị thối})}{\text{Tổng số rễ chính}} \times 100$$

Tăng trưởng chiều cao (cm/tháng), đo chiều cao tại vị trí bật chồi đến đỉnh sinh trưởng chồi ghép; đếm số lá mới trên chồi ghép, theo dõi 30 ngày/lần.

Phương pháp xử lý số liệu: số liệu được tổng hợp và xử lý thống kê bằng phần mềm Excel và SAS 9.1.3.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1. Tỉ lệ cây chết và rễ thối của các tổ hợp tiêu ghép sau 60 ngày lây nhiễm

TT	Tổ hợp ghép	Tần suất xuất hiện <i>P. capsici</i> trong đất (%)	Tỉ lệ cây chết (%)	Tỉ lệ rễ thối (%)
1	VL-L1	85,71 ^{ab}	13,33 ^{ab}	46,10 ^a
2	VL-V19	100,00 ^a	20,00 ^{ab}	50,37 ^a
3	VL-V21	100,00 ^a	40,00 ^a	69,18 ^a
4	VL-TrN	71,43 ^b	40,00 ^a	6,27 ^b
5	VL-TRNM	9,52 ^c	0 ^b	0,00 ^b
	CV (%)	18,09	25,11	16,90
	Mức ý nghĩa	**	*	**

Ghi chú: trong cùng một cột các số trung bình cùng ký tự theo sau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; (*) và (**) khác biệt có ý nghĩa thống kê $P \leq 0,05$ và $P \leq 0,01$.

Sau 60 ngày thí nghiệm, tần suất xuất hiện *P. capsici* trong đất từ 9,52 - 100,0%; Tỉ lệ cây chết dao động 0 - 40,0% và tỉ lệ rễ thối từ 0 - 69,18%. Trong đó, tổ hợp ghép trên gốc tiêu rừng Nam Mỹ (VL-TRNM) thể hiện tính kháng *P. capsici* với tần suất xuất hiện trong đất là 9,52%, không có cây chết và rễ thối do nhiễm nấm. Vì tiêu rừng Nam Mỹ chứa các enzyme liên quan đến cơ chế chống lại *P. capsici* (Nazeem *et al.*, 2008) và chứa

nguồn vi khuẩn nội sinh ức chế và đối kháng sự phát triển của *P. capsici* (Kollakkodan *et al.*, 2021). Các tổ hợp ghép còn lại mắc cảm với sự gây hại của *P. capsici*. Tổ hợp ghép trên gốc tiêu rừng (VL-TrN) có rễ thối thấp (6,27%) nhưng có tỉ lệ cây chết (40%) và tần suất xuất hiện nấm (71,43%) trong đất cao. Tổ hợp VL-L1, có tỉ lệ rễ thối là 46,1%, cây chết thấp 13,33% tỏ ra chống chịu với sự gây hại của *P. capsici*.

Bảng 2. Tăng trưởng, sinh khối của các tổ hợp tiêu ghép sau 60 ngày lây nhiễm

TT	Tổ hợp ghép trên gốc	Tốc độ tăng trưởng		Sinh khối tươi (g/cây)		
		Chiều cao (cm/tháng)	Số lá (lá/tháng)	Khối lượng thân, lá	Khối lượng rễ	Hệ số tươi/khô
1	VL-L1	8,89 ^c	1,39 ^c	18,86 ^d	3,10 ^d	4,24
2	VL-V19	15,83 ^b	2,10 ^{ab}	32,50 ^b	6,40 ^b	4,78
3	VL-V21	15,44 ^b	1,50 ^{bc}	33,47 ^b	4,26 ^c	4,39
4	VL-TrN	9,67 ^c	1,17 ^c	22,00 ^c	12,59 ^a	5,31
5	VL-TRNM	22,28 ^a	2,61 ^a	35,59 ^a	6,43 ^b	4,79
	CV (%)	13,95	18,34	3,62	4,95	10,76
	Mức ý nghĩa	**	**	**	**	ns

Ghi chú: trong cùng một cột các số trung bình cùng ký tự theo sau thì không khác biệt có nghĩa thống kê; ns: không khác biệt thống kê; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê $P \leq 0,01$.

Tốc độ tăng trưởng và sinh khối cây thể hiện sự phát triển của các tổ hợp hồ tiêu ghép. Nếu cây có tốc độ tăng trưởng nhanh và sinh khối lớn chứng tỏ khả năng tiếp hợp và tương thích giữa ngọn ghép và gốc ghép tốt. Tổ hợp VL-TRNM có tốc độ tăng trưởng (22,28 cm/tháng và 2,61 lá/tháng) và sinh khối (3,59 g thân lá tươi) lớn nhất, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các tổ hợp khác. Kế tiếp là 2 tổ hợp ghép cùng loài hồ tiêu (*Piper nigrum*) là VL-V19 (15,83 cm/tháng; 2,1 lá/tháng; 32,5 g thân lá tươi) và VL-V21 (15,44 cm/tháng; 1,5 lá/tháng; 33,47 g thân lá tươi) có tốc độ tăng trưởng và khối lượng thân lá tươi tương đương nhau. Tổ hợp trên gốc tràu không (VL-TrN) có tốc độ tăng trưởng và thân lá tươi kém hơn nhưng bộ rễ phát triển mạnh, khối lượng rễ tươi lớn nhất, đạt 12,59 g. Mặc dù bộ rễ lớn, tỉ lệ rễ bị thối thấp (6,27%) nhưng tỉ lệ cây chết của tổ hợp ghép trên gốc tràu không (VL-TrN) cao, chiếm 40%. Tổ hợp ghép cùng loài trên gốc L1 (VL-L1) sinh trưởng tương đương VL-TrN và sinh khối tươi thấp, bộ rễ bé. Tuy nhiên, tỉ lệ cây chết của VL-L1 thấp, chiếm 13,33%. Đây

có thể là do phụ thuộc vào đặc điểm sinh lý của giống gốc ghép, cây phát triển kém hơn nhưng chống chịu tốt hơn các tổ hợp khác.

Ngoài ảnh hưởng của *P. capsici*, bộ rễ của cây tiêu ghép còn phụ thuộc vào đặc tính sinh lý của cây gốc ghép. Tổ hợp VL-TrN có bộ rễ phát triển tốt nhất, đạt 12,59 g/cây, tuy nhiên tốc độ tăng trưởng của VL-TrN lại kém và tỉ lệ rễ thối cũng như tỉ lệ cây chết cao, điều này thể hiện khả năng chống chịu kém. Bộ rễ của VL-V19 và VL-V21 đạt 6,4 và 4,26 g/cây nhưng tỉ lệ cây chết và rễ thối cao, thể hiện miễn cảm với sự gây hại của *P. capsici*. Bộ rễ của VL-L1 bé nhất, đạt 3,1 g/cây nhưng tỉ lệ cây chết thấp 13,33%, có thể VL-L1 biểu hiện khả năng chống chịu với *P. capsici*.

4. KẾT LUẬN

Trong điều kiện thí nghiệm trong nhà màng, tổ hợp ghép tiêu Vĩnh Linh trên gốc tiêu rừng Nam Mỹ (VL-TRNM) kháng với *P. capsici* với tần suất xuất hiện nấm trong đất thấp, không có cây chết, rễ không bị thối; tốc độ tăng trưởng về chiều

cao cây, ra lá mới và sinh khối cây ghép tốt nhất. Tổ hợp VL-L1 có tỉ lệ cây chết thấp, 13,33% và tỉ lệ rễ thối khá cao, 46,1%. Các tổ hợp ghép còn lại miễn cảm với *P. capsici* với tần suất xuất hiện nấm trong đất, tỉ lệ cây chết, tỉ lệ rễ thối cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục Bảo vệ thực vật (2016). Xây dựng và phát triển mô hình sản xuất hồ tiêu an toàn, bền vững để nâng cao giá trị. Hội nghị Xây dựng và phát triển mô hình sản xuất hồ tiêu an toàn, bền vững để nâng cao giá trị, tổ chức tại Gia Lai tháng 3/2016.
2. Cục Bảo vệ thực vật (2019). Báo cáo kết quả kiểm tra tình hình sản xuất hồ tiêu trên địa bàn các tỉnh Tây Nguyên và giải pháp khắc phục. Đánh giá tình hình sản xuất hồ tiêu trên địa bàn các tỉnh Tây Nguyên, tháng 3/2019.
3. Cục Bảo vệ thực vật (2022). Báo cáo tổng kết công tác BVTV năm 2022; Phương hướng, nhiệm vụ công tác năm 2023 của các tỉnh duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên. Hội nghị tổng kết công tác bảo vệ thực vật 2022, kế hoạch công tác năm 2023 các tỉnh duyên hải Nam Trung Bộ và Tây Nguyên, tổ chức tại Đắk Lắk ngày 17/12/2022.
4. Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. *Phytophthora Diseases Worldwide*.
5. Kollakkodan, N., Anith, K. N., & Nysanth, N. S. (2021). Endophytic bacteria from *Piper colubrinum* suppress *Phytophthora capsici* infection in black pepper (*Piper nigrum* L.) and improve plant growth in the nursery. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(1 - 2), 86 - 108.
6. Kueh, T. K., & Kuthubutheen, A. J. (1990). *Phytophthora* foot rot of black pepper. *Proceedings 3rd International Conference on Plant Protection in the Tropics: Volume IV, Malaysian Plant Protection Society (Malaysia)*. 3. International Conference on Plant Protection in the Tropics, Genting Highlands, Pahang (Malaysia) - 20 - 23 Mar 1990.
7. Nazeem, P. A., Achuthan, C. R., Babu, T. D., Parab, G. V., Girija, D., Keshavachandran, R., & Samiyappan, R. (2008). Expression of pathogenesis related proteins in black pepper (*Piper nigrum* L.) in relation to *Phytophthora* foot rot disease. *Journal of Tropical Agriculture*, 46(0).
8. Nguyễn Trần Quyên, Trần Thị Diệu Hiền, Dương Thị Oanh, Nguyễn Quang Ngọc. (2020). Nghiên cứu về giống và các biện pháp kỹ thuật tổng hợp phát triển hồ tiêu bền vững. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ. Viện KHKT NLN Tây Nguyên.
9. Trần Thị Diệu Hiền, Nguyễn Quang Ngọc, Dương Thị Oanh, Nguyễn Trần Quyên. (2019). Khả năng kháng nấm *Phytophthora capsici* và tuyến trùng *Meloidogyne incognita* của một số vật liệu làm gốc ghép cho cây hồ tiêu tại Việt Nam. Tạp chí Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
10. VPA (2022). Kỹ yếu hồ tiêu 2022. Hiệp hội Hồ tiêu Việt Nam.

ABSTRACT

Investigate black pepper grafted combinations to resist quick wilt disease caused by *Phytophthora capsici*

Evaluating the different black pepper grafted combinations against infection of P. capsici which causes phytophthora foot rot (quick wilt disease) in the greenhouse conditions indicated that: grafted black pepper seedlings names VL-TRNM shows no root rot on the root system and mortality after 60 days after P. capsici infection followed by VL - L1 with low percentage of mortality (13,33%).

Keywords: black pepper, grafted combinations, *Phytophthora capsici*, resistance.

HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI GỐC CHẢY NHỰA DO NẤM *Phytophthora* spp. GÂY HẠI CÂY CAM SÀNH (*Citrus nobilis* Lauriro) CỦA MỘT SỐ LOẠI THUỐC TRỪ BỆNH

Trần Thị Thường^{1*}, Phan Lý Thùy Mai¹,
Nguyễn Xuân Hoà¹, Mai Thị Hạnh¹,
Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹

¹Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI)
E-mail liên hệ: thuongwasi@gmail.com

TÓM TẮT

Bệnh thối gốc chảy nhựa gây hại cam do nấm *Phytophthora* spp. là bệnh nguy hiểm và phổ biến nhất hiện nay. Trong xu hướng phát triển nông nghiệp bền vững, các giải pháp giảm dần thuốc hoá học, tăng sử dụng thuốc sinh học, đảm bảo thời gian cách ly đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi để kiểm soát dịch hại cây trồng. Kết quả thử nghiệm cho thấy cả 4 công thức xử lý thuốc đều cho hiệu lực phòng trừ bệnh thối gốc chảy nhựa. Hiệu lực tăng dần qua các đợt theo dõi và đạt cao nhất tại thời điểm 5 tháng sau xử lý thuốc. Trong đó xử lý thuốc Agri - Fos 400SL (Phosphonate) kết hợp Vi - ĐK 10⁹ bào từ/g (*Trichoderma* spp.) cho hiệu lực cao nhất làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh đạt 91,67% và 96,30% tương ứng sau 5 tháng xử lý.

Từ khoá: cây cam sành, kiểm soát, bệnh thối gốc chảy nhựa, *Phytophthora* spp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam sành thuộc chi cam chanh, có nguồn gốc từ Việt Nam. Cam sành được gán nhiều tên khoa học khác nhau như *Citrus nobilis* Lauriro, *Citrus reticulata* L. hay *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Hume H. H., 1957).

Trong sản xuất, bệnh thối gốc chảy nhựa do nấm *Phytophthora* spp. là bệnh nguy hiểm và phổ biến nhất. Biểu hiện ban đầu là vết bệnh ở phần vỏ của thân cây vùng sát gốc. Vết bệnh thối nâu thành những hình dạng bất định. Sau đó, vùng

bệnh khô và nứt dọc thân cây, vỏ cây bắt đầu bong ra, phần gỗ sát vỏ bị thối nâu, vết thối lan rộng dần ra xung quanh. Tại các vết bệnh thường xuất hiện dịch nhựa màu vàng chảy ra. Trường hợp bệnh lây lan nặng thì vết thối sẽ lan xuống rễ chính, làm các rễ tơ không phát triển được. Từ đó cây không hút và vận chuyển được nước và dinh dưỡng để nuôi cây, khiến cây bị còi cọc, không phát triển đợt non, cành chết dần, cây xơ xác. Hiện nay việc sử dụng thuốc hóa học để kiểm soát sâu bệnh hại là chủ yếu. Trong xu hướng phát triển nông nghiệp an toàn, bền vững, các giải pháp giảm dần thuốc hóa học, tăng sử

Người phân biên: ThS. Đào Thị Lan Hoa

dụng thuốc sinh học, đảm bảo thời gian cách ly đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi. Do vậy việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học kết hợp sinh học phòng trừ hiệu quả bệnh thối gốc, chảy nhựa cây cam sẽ có ý nghĩa rất lớn trong sản xuất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- **Địa điểm:** thí nghiệm được tiến hành trên vườn cam sành trồng thuần năm 2013, mật độ trồng 800 cây/ha, tại xã Ea wer, huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk.

- **Thời gian thí nghiệm:** vào năm 2020 (từ tháng 5 đến tháng 12).

- **Phương pháp bố trí thí nghiệm:** thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD), gồm 5 công thức, nhắc lại 3 lần; mỗi ô thí nghiệm gồm 8 cây cam sành.

- Các công thức thí nghiệm:

Công thức 1: Acrobat MZ 90/600 WP (Dimethomorph 90 g/kg + Mancozeb 600 g/kg) (quét lên vết bệnh (nồng độ 0,5%) và phun lên cây + tưới gốc (nồng độ 0,25%), 3 lít dung dịch/cây) + Actino-Iron 1.3 SP (*Streptomyces lydicus* 1,3% + Fe 21,9% + Humic acid 47%) (3 g/cây, phun lên cây + tưới gốc, 3 lít dung dịch/cây).

Công thức 2: Profiler 711.1 WG (Fluopicolide (min 97%) 44,4 g/kg + Fosetyl-aluminium 666.7 g/kg) (quét lên vết bệnh (nồng độ 0,3%) và phun lên cây + tưới gốc (nồng độ 0,15%), 3 lít dung dịch/cây) + Actino-Iron 1.3 SP (*Streptomyces lydicus* 1,3% + Fe 21,9% + Humic acid 47%) (3 g/cây, phun lên cây + tưới gốc, 3 lít dung dịch/cây).

Công thức 3: Alpine 80WG (Fosetyl - aluminium) (quét lên vết bệnh (nồng độ 0,4%) và phun lên cây + tưới gốc (nồng độ 0,2%), 3 lít dung dịch/cây) + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP (*Trichoderma* spp.) (50 g/cây, phun lên cây + tưới gốc, 3 lít dung dịch/cây).

Công thức 4: Agri-Fos 400SL (Phosphorous acid) (quét lên vết bệnh (nồng độ 1%) và phun lên cây + tưới gốc (nồng độ 0,5%), 3 lít dung dịch/cây + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP (*Trichoderma* spp.) (50 g/cây: phun lên cây + tưới gốc, 3 lít dung dịch/cây).

Công thức 5: đối chứng (không xử lý).

- Thời gian xử lý thuốc:

+ **Thuốc hóa học:** Acrobat MZ 90/600 WP, Profiler 711.1 WG, Alpine 80WG, Agri-Fos 400SL được xử lý 2 lần, lần đầu vào tháng 5, lần 2 xử lý sau lần đầu 30 ngày (tháng 6).

+ **Thuốc sinh học:** Actino-Iron 1.3 SP, Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP xử lý 2 lần sau xử lý thuốc hóa học 30 ngày và lần 2 xử lý sau lần đầu 30 ngày.

- **Chỉ tiêu theo dõi:** tỉ lệ bệnh và chỉ số bệnh thối gốc chảy nhựa (%); hiệu lực phòng trừ bệnh thối gốc chảy nhựa (%).

- **Phương pháp điều tra:** Điều tra toàn bộ số cây trong từng công thức, mỗi cây theo dõi và phân cấp vết bệnh hại trên gốc, thân theo QCVN 01 - 119 : 2012 cụ thể như sau:

$$\text{Tỉ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \times 100$$

Chỉ số bệnh (CSB) (%):

$$CSB(\%) = \frac{\sum(axb)}{N \times T} \times 100$$

Trong đó: $\sum(axb)$: tổng của tích số giữa cây bị bệnh với cấp bệnh tương ứng.

T: cấp bệnh cao nhất trong bảng phân cấp.

N: tổng số cây điều tra.

Phân cấp bệnh thối gốc chầy nhựa hại cam gồm 5 cấp bệnh như sau:

- + Cấp 0: không có vết bệnh
- + Cấp 1: < 10% chu vi thân bị bệnh
- + Cấp 3: 10 - 20% chu vi thân bị bệnh
- + Cấp 5: 20 - 40% chu vi thân bị bệnh
- + Cấp 7: 40 - 80% chu vi thân bị bệnh
- + Cấp 9: > 80% chu vi thân bị bệnh.

Công thức tính hiệu lực thuốc (công thức Henderson - Tilton):

$$H(\%) = \left(1 - \frac{Ta \times Cb}{Ca \times Tb}\right) \times 100$$

Trong đó: H: hiệu lực của thuốc.

Ta: tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh của công thức thí nghiệm sau khi xử lý thuốc.

Tb: tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh của công thức thí nghiệm trước khi xử lý thuốc.

Ca: tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh của công thức đối chứng sau khi xử lý thuốc.

Cb: tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh của công thức đối chứng trước khi xử lý thuốc.

- **Thời gian điều tra:** trước khi xử lý, sau khi xử lý thuốc định kỳ 1 tháng/lần (6 lần/năm).

- **Phương pháp xử lý số liệu:** số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và SAS version 9.1.



Vết bệnh



Cạo, quét thuốc thí nghiệm



Phun lên cây, tưới gốc

Hình 1. Quét thuốc và phun thuốc lên cây cam sành

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trước xử lý, tỉ lệ bệnh thối gốc chầy nhựa ở các công thức dao động từ

16,67% đến 25% và không có sự khác biệt thống kê giữa các công thức thí nghiệm với nhau.

Bảng 1. Tỷ lệ cây cam bị bệnh thối gốc chảy nhựa (%)

Công thức	Thời điểm theo dõi					
	TXL	1 tháng SXL	2 tháng SXL	3 tháng SXL	4 tháng SXL	5 tháng SXL
Acrobat MZ90/600 WP + Actino-Iron 1.3 SP	16,67	16,67	16,67	12,50	12,50 ^b	12,50 ^{ab}
Profler 711.1 WG + Actino-Iron 1.3 SP	20,83	20,83	20,83	20,83	16,67 ^{ab}	12,50 ^{ab}
Alpine 80WG + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g AP	16,67	16,67	16,67	12,50	12,50 ^b	8,33 ^b
Agri-Fos 400SL + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g AP	25,00	25,00	20,83	12,50	12,50 ^b	4,17 ^b
Đối chứng (không xử lý)	16,67	20,83	25,00	29,17	33,33 ^a	33,33 ^a
<i>P</i> _(0,05)	NS	NS	NS	NS	*	*

Ghi chú: trong cùng một cột, những giá trị trung bình có cùng ký tự là không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; NS: không có ý nghĩa thống kê; *: có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; TXL: trước xử lý; SXL: sau xử lý.

Sau hai đợt xử lý thuốc hóa học 1 tháng (sau xử lý lần 1 khoảng 3 tháng), ở cả 4 công thức có xử lý thuốc, tỉ lệ cây cam sành bị bệnh thối gốc chảy nhựa đã kiểm soát được sự lây lan gia tăng và bắt đầu giảm xuống so với trước xử lý thuốc. Một số cây bị bệnh nhẹ (cấp 1) có vết bệnh khô hẳn, liền da sau khi được cạo lớp vỏ bệnh và quét thuốc kết hợp phun thuốc diệt nấm trên mặt đất và trên cây. Xử lý Agri-Fos 400SL có tỉ lệ cây bị bệnh giảm đi nhiều nhất, từ 25% (trước xử lý) giảm xuống 12,50% sau xử lý 3 tháng (giảm 12,50%). Riêng ở công thức đối chứng (không xử lý) thì tỉ lệ cây bị bệnh bắt đầu tăng lên, từ 16,67% trước xử lý tăng lên 29,17% sau 3 tháng (tăng 12,50%).

Tỉ lệ cây cam sành bị bệnh thối gốc chảy nhựa tiếp tục giảm sau khi phun hai đợt chế phẩm sinh học. Cả hai loại chế phẩm sinh học đều có hiệu lực kiểm soát nấm bệnh phát triển, làm giảm hẳn sự lây lan gây bệnh. Kết hợp thuốc hóa học với chế phẩm sinh học, công thức xử lý Agri-Fos 400SL + Vi-ĐK10⁹ bào tử/g AP có tỉ lệ cây bị bệnh giảm nhiều rõ rệt, từ 25,00% trước xử lý giảm xuống chỉ còn 4,17% cây bị bệnh sau 5 tháng xử lý

(giảm 20,83%). Kế đến là công thức xử lý Alpine 80WG + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP tỉ lệ cây bệnh giảm xuống còn 8,33%. Hai công thức xử lý Acrobat MZ 90/600 WP và Profler 711.1 WG kết hợp với chế phẩm sinh học Actino-Iron 1.3 SP cũng có tác dụng trong việc làm giảm tỉ lệ cây cam sành bị bệnh thối gốc chảy nhựa. Ở công thức đối chứng (không xử lý), tỉ lệ cây cam sành bị bệnh tăng dần qua các đợt điều tra, tăng cao nhất đạt 33,33% và có sự khác biệt có ý nghĩa so với các công thức có xử lý thuốc đặc biệt từ 4 đến 5 tháng sau xử lý thuốc.

Tính toán hiệu lực của các công thức thuốc sử dụng (bảng 2) cho thấy cả 4 công thức đều cho hiệu lực kiểm soát bệnh thối gốc chảy nhựa ngay sau 1 tháng xử lý đạt 20% và tăng dần qua các đợt theo dõi. Hiệu lực sử dụng thuốc đạt cao nhất vào thời điểm sau 5 tháng xử lý. Hiệu lực cao nhất là công thức sử dụng Agri-Fos 400 SL + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP đạt 91,67%. Kế đến là công thức xử lý Alpine 80 WG + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP cũng có hiệu lực đạt 75,00%. Hai công thức còn lại hiệu lực làm giảm tỷ lệ cây bị bệnh cũng đạt trên 60%.

Bảng 2. Hiệu lực thuốc tính trên tỉ lệ cây cam bị bệnh thối gốc chảy nhựa (%)

Công thức	Thời điểm theo dõi				
	1 tháng SXL	2 tháng SXL	3 tháng SXL	4 tháng SXL	5 tháng SXL
Acrobat MZ 90/600 WP + Actino-Iron 1.3 SP	20,00	33,33	57,14	62,50	62,50
Profler 711.1 WG + Actino-Iron 1.3 SP	20,00	33,33	42,86	60,00	70,00
Alpine 80 WG + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g AP	20,00	33,33	57,14	62,50	75,00
Agri-Fos 400 SL + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g AP	20,00	44,44	71,43	75,00	91,67

Ghi chú: SXL: sau xử lý.

Bảng 3. Chỉ số bệnh thối gốc chảy nhựa (%)

Công thức	Thời điểm theo dõi					
	TXL	1 tháng SXL	2 tháng SXL	3 tháng SXL	4 tháng SXL	5 tháng SXL
Acrobat MZ90/600 WP + Actino-Iron 1.3 SP	4,63	4,63	2,78	2,31	2,31 ^b	1,39 ^b
Profler 711.1 WG + Actino-Iron 1.3 SP	6,02	6,02	3,24	3,24	1,85 ^b	1,39 ^b
Alpine 80WG + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g	4,63	4,63	2,78	2,31	1,39 ^b	0,93 ^b
Agri-Fos 400SL + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g	5,56	5,56	3,24	1,39	1,39 ^b	0,46 ^b
Đối chứng (Không xử lý)	3,70	4,17	4,63	6,02	8,33 ^a	8,33 ^a
$P_{(0,05)}$	NS	NS	NS	NS	*	*

Ghi chú: trong cùng một cột, những giá trị trung bình có cùng ký tự là không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; NS: không có ý nghĩa thống kê; *: có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; TXL: trước xử lý; SXL: sau xử lý.

Mức độ bệnh thối gốc chảy nhựa trên cây cam được đánh giá dựa vào chu vi thân bị bệnh, phân cấp thành các cấp độ từ 1 đến 9. Thời điểm trước khi xử lý thuốc, mức độ bệnh trên cây ở mức thấp và dao động từ 3,70% đến 6,02% tương ứng với các cây bệnh ở cấp 1 và 3.

Sau khi xử lý, chỉ số bệnh thối gốc chảy nhựa giảm dần ở 4 công thức xử lý thuốc. Việc cạo lớp vỏ bị thối sau đó quét các loại thuốc hóa học đã ngăn chặn nấm gây thối gốc, vết bệnh bắt đầu khô dần, tái sinh lớp vỏ mới, vết thương lành hẳn sau hai đợt quét thuốc hóa học. Từ đó, chu vi

vết bệnh nhỏ lại, nhiều vết bệnh đã lành hoàn toàn, mức độ bệnh chỉ còn ở cấp độ 1 hoặc không bị bệnh. Công thức có chỉ số bệnh giảm nhiều nhất là công thức xử lý Agri-Fos 400 SL + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP, tỉ lệ bệnh giảm từ 5,56% trước xử lý xuống chỉ còn 0,46% sau 5 tháng xử lý. Các công thức khác cũng có chỉ số bệnh giảm xuống tương đương. Riêng công thức đối chứng (không xử lý thuốc), các vết bệnh lan rộng, thối gốc và chảy nhựa nhiều, mức độ bệnh tăng lên ở cấp 3, cấp 5, do đó chỉ số bệnh tăng từ 3,7% trước xử lý lên 8,33% sau xử lý 5 tháng.

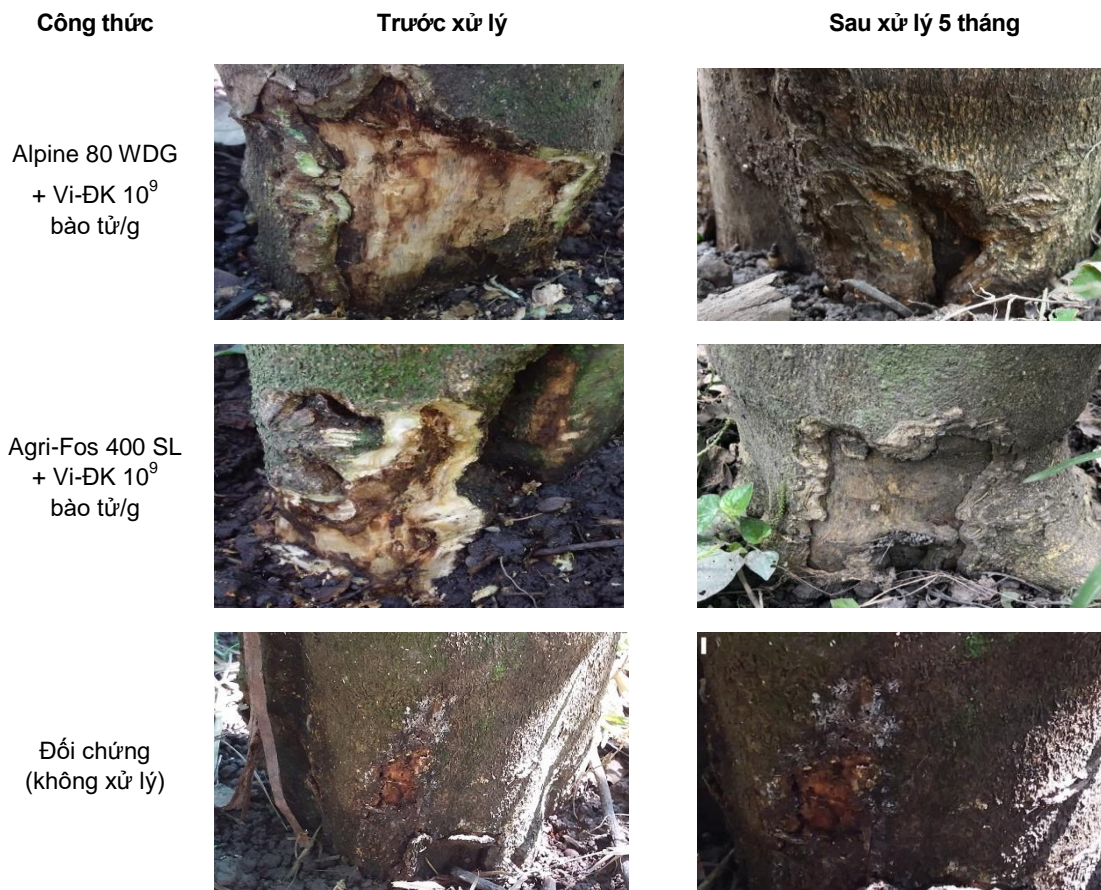
Bảng 4. Hiệu lực thuốc tính trên chỉ số bệnh thối gốc chảy nhựa cây cam sành (%)

Công thức	Thời điểm theo dõi				
	1 tháng SXL	2 tháng SXL	3 tháng SXL	4 tháng SXL	5 tháng SXL
Acrobat MZ 90/600 WP + Actino-Iron 1.3 SP	11,11	52,00	69,23	77,78	86,67
Profler 711.1 WG + Actino-Iron 1.3 SP	11,11	56,92	66,86	86,32	89,74
Alpine 80WG + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g	11,11	52,00	69,23	86,67	91,11
Agri-Fos 400SL + Vi-ĐK 10 ⁹ bào tử/g	11,11	53,33	84,62	88,89	96,30

Ghi chú: SXL: sau xử lý.

Tính toán hiệu lực phòng trừ bệnh thối gốc chảy nhựa qua chỉ số bệnh thối gốc chảy nhựa cây cam sành cho kết quả tương tự đối với tỉ lệ bệnh. Sau 5 tháng, hiệu lực làm giảm chỉ số bệnh thối gốc chảy nhựa đạt cao nhất ở công thức sử dụng Agri-Fos 400 SL + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g AP đạt 96,30%. Tiếp đến là công thức xử lý

Alpine 80 WG + Vi-ĐK 10⁹ bào tử/g đạt 91,11%. Hai công thức còn lại cũng cho hiệu lực phòng trừ trên 80%. Vậy kết quả đánh giá hiệu lực của 4 công thức thuốc này đều cho hiệu lực cao kiểm soát bệnh thối gốc chảy nhựa gây hại cây cam sành và kết quả này tương tự kết quả năm 2019 (Hoàng Mạnh Cường và cs., 2019).

**Hình 2. Vết bệnh thối gốc xì mù trên cây cam sành ở các công thức thí nghiệm**

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Cả 4 công thức xử lý đều có hiệu lực phòng trừ bệnh thối gốc chảy nhựa trên cây cam, hiệu lực phòng trừ tăng lên qua các đợt theo dõi và đạt cao nhất sau 5 tháng xử lý. Trong đó, công thức xử lý Agri-Fos 400 SL (Phosphonate) + Vi-ĐK 10^9 bào tử/g AP (*Trichoderma* spp.) có hiệu lực cao nhất, làm giảm tỉ lệ bệnh và chỉ số bệnh thối gốc chảy nhựa, đạt 91,67% và 96,30% tương ứng sau 5 tháng xử lý.

4.2. Đề nghị

Sử dụng thuốc Agri-Fos 400 SL (Phosphorous acid): dùng dao cạo lớp vỏ ngoài của vết bệnh, quét thuốc lên vết bệnh với nồng độ 1% và phun lên cây + tưới gốc nồng độ 0,5%, 3 lít dung dịch/cây, 2 lần vào đầu mùa mưa (tháng 5 - 6). Sau 2

tháng sử dụng chế phẩm Vi-ĐK 10^9 bào tử/g AP (*Trichoderma* spp.) (50 g/cây: phun lên cây + tưới gốc, 3 lít dung dịch/cây); xử lý 2 lần, cách nhau 1 tháng để phòng trừ bệnh thối gốc chảy nhựa hại cam sành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2012. QCVN 01-119:2012/BNNPTNT Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện sinh vật hại trên cây ăn quả có múi, Bộ Nông nghiệp và PTNT ngày 14 tháng 12 năm 2012.
2. Hoàng Mạnh Cường và cộng sự, 2019. Báo cáo đề tài năm 2019 “Nghiên cứu tuyển chọn giống và hoàn thiện quy trình kỹ thuật thâm canh chuối, sầu riêng, cam, bơ phục vụ nội tiêu và xuất khẩu cho các tỉnh Tây Nguyên”, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.
3. Hume H. H., 1957. Citrus fruit, New York, The Macmilan company.

ABSTRACT

Control efficiency of some fungicides for gummosis stem canker caused by *Phytophthora* spp. on king mandarin (*Citrus nobilis* Lauriro)

*Gummosis stem canker on King mandarin caused by the fungus Phytophthora spp. is the most common and dangerous disease. In the trend of sustainable agricultural development, solutions to reduce chemical uses, increase biological ones and ensure an isolation period have been widely studied and applied to control plant diseases. Trial results showed that all four treatments were effective for disease control. Control efficiency increased gradually over the follow-up sessions and reached its peak at 5 months after measure applications. Among the experimental treatments, Agri-Fos 400 SL (Phosphorous acid) combined with Vi-ĐK 10^9 spores per gram (*Trichoderma* spp.) showed the highest effectiveness in reducing the disease rate and indexes at 91.67% and 96.30%, respectively after five months of measure applications.*

Keywords: king mandarin, control, gummosis stem canker, *Phytophthora* spp.

MỤC LỤC

1. DIỄN VĂN KHAI MẠC HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM
LẦN THỨ 22 NGÀY 21 - 23/7/2023 TẠI TÂY NGUYÊN 3
GS.TS. Vũ Triệu Mân
2. VÔ CÙNG THƯƠNG TIẾC PGS. PHẠM VĂN KIM, NHÀ KHOA HỌC LỚN
CỦA NGÀNH BỆNH CÂY VÀ BẢO VỆ THỰC VẬT VIỆT NAM 12
GS.TS. Vũ Triệu Mân
3. TỔNG QUAN: GIỐNG KHÁNG BỆNH TRONG KỶ NGUYÊN OMICS 14
Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang
4. CÂY CỌC RÀO (*Jatropha curcas*) LÀ KÝ CHỦ TỰ NHIÊN
CỦA VIRUS KHẢM LÁ SẴN SRI LANKA (*Sri Lankan cassava mosaic virus*)
TẠI VIỆT NAM 32
*Trần Văn Chiến, Nguyễn Thị Khánh Huyền,
Lê Thị Lan Hương, Trịnh Xuân Hoat, Hà Viết Cường*
5. ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA NHÓM GENE MÃ HÓA
TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE LIÊN QUAN ĐẾN ĐÁP ỨNG
BỆNH SỌC NÂU VIRUS Ở CÂY SẴN (*Manihot esculenta*) 45
*Chu Đức Hà, Hà Thị Quyển, Phạm Châu Thùy,
La Việt Hồng, Đồng Huy Giới, Nguyễn Quốc Trung, Lê Huy Hàm*
6. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA
VI KHUẨN *Pectobacterium carotovorum* GÂY BỆNH THỐI NHŨN HÀNH, TỎI
VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA MỘT SỐ LOẠI HOẠT CHẤT
BẢO VỆ THỰC VẬT ĐẾN VI KHUẨN TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro* 53
*Ngô Quang Huy, Lê Quang Mẫn, Nguyễn Mạnh Hùng,
Lê Thị Hằng, Trần Thị Hoa, Nguyễn Văn Tuất*
7. ĐÁNH GIÁ BỆNH VÀNG LÁ GREENING
TRÊN CÂY QUÝT HỒNG (*Citrus reticulata*) TẠI HUYỆN LAI VUNG,
TỈNH ĐỒNG THÁP 61
Lê Minh Tường, Đinh Hoàng Kha, Lê Thị Ngọc Xuân, Lê Văn Vàng

8. KHẢO SÁT HOẠT CHẤT POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA LÁ LÚA BỊ BỆNH BẠC LÁ DO *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KHI KÍCH KHÁNG BẰNG DỊCH TRÍCH LÁ SỐNG ĐỜI 66
Nguyễn Đức Độ, Đỗ Văn Tuyền, Phạm Trần Tuyết Mai, Nguyễn Thái Phúc Thịnh, Nguyễn Đắc Khoa, Trương Văn Xạ
9. KHẢ NĂNG VÀ CƠ CHẾ KÍCH KHÁNG BỆNH BẠC LÁ KHI NGÂM HẠT GIỐNG KẾT HỢP PHUN LÊN LÁ LÚA DỊCH TRÍCH LÁ CỎ CÚT HEO (*Ageratum conyzoides*) 73
Trương Văn Xạ, Trần Minh Hiền, Nguyễn Đắc Khoa
10. KHẢ NĂNG GIÚP GIẢM BỆNH BẠC LÁ LÚA CỦA HỖN HỢP HAI VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus safensis* AG-131 VÀ *Bacillus stratosphericus* AG-62 84
Thái Quốc Khánh, Nguyễn Đắc Khoa
11. TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY ĐỂ KÍCH THÍCH KHẢ NĂNG TẠO BÀO TỬ CỦA VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *Bacillus safensis* AG-131 PHÒNG TRỊ BỆNH BẠC LÁ LÚA 91
Thái Trần Anh Thư, Bùi Khánh Vy, Nguyễn Quang Tiến, Nguyễn Đắc Khoa
12. KHẢO SÁT HÀM LƯỢNG CỦA HỢP CHẤT POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA TRONG LÁ LÚA Ở CÁC GIAI ĐOẠN BỆNH BẠC LÁ DO *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 97
Trương Văn Xạ, Nguyễn Lâm Trang Nhã, Nguyễn Quang Khương, Phạm Thảo Nguyên, Nguyễn Đắc Khoa, Nguyễn Đức Độ
13. XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH HÉO XANH TRÊN CÂY KHOAI LANG VÀ PHÒNG TRỪ BỆNH BẰNG THỰC KHUẨN THỂ TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 105
Nguyễn Văn Phong, Huỳnh Thị Kim Ngân, Đoàn Thị Kiều Tiên, Nguyễn Thị Thu Nga
14. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN VÙNG RỄ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN, NĂNG SUẤT VÀ TÌNH HÌNH BỆNH HẠI TRÊN CÂY LÚA TÍM (*Oryza sativa* L.) TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ MÀNG 114
Nguyễn Thị Hương Cẩm, Tiên Huỳnh, Nguyễn Văn Nam

15. TUYỂN CHỌN XẠ KHUẨN VÙNG RỄ CÂY HỒ TIÊU
CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG *Fusarium* sp. VÀ TUYỂN TRÙNG *Meloidogyne* sp.
TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro* 125
Trịnh Thị Huyền Trang, Trần Thị Phương Hạnh, Lê Thị Thu Sa
16. ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ pH MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY
ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN
VỚI NẤM *Colletotrichum* sp. TRONG ĐIỀU KIỆN *in vitro* 134
Võ Thị Hương Dương, Lê Nam Đô, Nguyễn Phú Dũng
17. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA XẠ KHUẨN ĐỐI VỚI NẤM
Colletotrichum sp. GÂY BỆNH THÁN THƯ HẠI NHÃN (*Dimocarpus longan*)
TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM 140
Lê Minh Tường, Lê Minh Quân, Lê Thị Ngọc Xuân
18. PHÁT HIỆN NẤM *Pestalotiopsis* sp. GÂY BỆNH ĐÓM LÁ
TRÊN LAN *Dendrobium* spp. 148
*Huyền Thị Hồng Phấn, Tôn Thị Kim Thoa, Trần Thị Vân,
Võ Thị Thúy Huệ, Lê Đình Đôn, Bùi Cách Tuyền*
19. NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN NẤM CÓ ÍCH
TRONG ĐẤT TRỒNG CÂY CÔNG NGHIỆP 156
*Ngô Công Hậu, Võ Thị Ngọc Quyền, Trần Giang Đại Nghĩa,
Trần Thị Vân, Nguyễn Ngọc Linh, Trần Đức Thắng, Lê Đình Đôn*
20. PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH NẤM *Colletotrichum gloeosporioides*
GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN CÂY CAM TẠI CAO PHONG, HÒA BÌNH 163
*Phạm Quang Huy, Hồ Mạnh Tường, Trần Thị Hoa,
Nguyễn Thị Hồng Hà, Lê Văn Mạnh, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát*
21. NGHIÊN CỨU TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ ẢNH HƯỞNG
CỦA KỸ THUẬT ĐÓN TĨA CÀNH ĐẾN BỆNH PHẤN TRẮNG TRÊN CÂY TÁO
TẠI NAM TRUNG BỘ 171
*Mai Văn Hào, Nguyễn Văn Chính, Nguyễn Thị Bích Ngọc,
Phan Công Kiên, Nguyễn Văn Liêm, Phạm Dũng, Phạm Mỹ Liên*
22. BỆNH PHẤN TRẮNG (*Oidium heveae*) HẠI TÁO
(Rhamnaceae: *Ziziphus mauritiana*) Ở CÁC THỜI VỤ CẮT CÀNH KHÁC NHAU
TẠI NINH THUẬN 182
*Mai Văn Hào, Nguyễn Văn Chính, Phan Công Kiên,
Phan Văn Tiêu, Võ Thị Kim Trâm, Võ Đức Khá, Phạm Mỹ Liên*

23. TRÌNH TỰ VÙNG rDNA - ITS CỦA NẤM *Pestalotiopsis* spp.
và *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH RỤNG LÁ ĐÓM TRÒN TRÊN CÂY CAO SU
Ở VIỆT NAM 189
*Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Thị Kim Uyên,
Nguyễn Thị Thanh Trang, Nguyễn Ngọc Mai,
Nguyễn Phương Vinh, Đoàn Nhân Luân và Nguyễn Anh Nghĩa*
24. ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI NẤM *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp.
GÂY BỆNH RỤNG LÁ ĐÓM TRÒN MỚI PHÁT HIỆN TRÊN CÂY CAO SU
TẠI TỈNH ĐỒNG NAI VÀ BÌNH PHƯỚC 196
*Nguyễn Đôn Hiệu, Nguyễn Thị Thanh Trang,
Nguyễn Thị Kim Uyên, Nguyễn Ngọc Mai,
Nguyễn Phương Vinh, Đoàn Nhân Luân và Nguyễn Anh Nghĩa*
25. BỆNH HÉO RŨ PANAMA (*Fusarium oxysporum* sp.) TRÊN CHUỐI Ở VIỆT NAM
VÀ ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU 202
Trần Thanh Dũng
26. THÀNH PHẦN NẤM *Colletotrichum* GÂY BỆNH THÁN THƯ HẠI SÀU RIÊNG
TẠI THÀNH PHỐ BUÔN MA THUỘT, TỈNH ĐẮK LẮK 210
*Nguyễn Văn Nam, Nguyễn Quốc Trung,
Ngô Văn Anh, Đào Thị Lan Hoa, Đỗ Thị Kiều An*
27. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÝ SINH TRÚNG
TUYÊN TRÙNG *Meloidogyne incognita* CỦA MỘT SỐ DÒNG VI SINH VẬT
PHÂN LẬP TẠI TÂY NGUYÊN 220
*Nguyễn Văn Nam, Đỗ Thị Kiều An,
Đào Thị Lan Hoa, Nguyễn Văn Bốn*
28. SỬ DỤNG DỊCH CHIẾT TỎI PHÒNG TRỪ
BỆNH THÁN THƯ (*Colletotrichum* spp.) HẠI ỚT CAY 228
Võ Thị Dung, Hà Minh Thanh, Vũ Triệu Mân, Nguyễn Hoàng Tiến
29. ẢNH HƯỞNG CỦA THAN SINH HỌC TỪ VỎ QUẢ CÀ PHÊ
VÀ CHẾ PHẨM *Trichoderma* ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN
VÀ NĂNG SUẤT CÂY CÀ PHÊ VÓI (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*) 235
*Đỗ Thị Kiều An, Trịnh Công Huyền Vy, Trần Thị Huệ,
Nguyễn Thị Hương Cẩm, Trang Thị Nguyệt Quế, Nguyễn Văn Nam*

30. TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC CỦA NANO CHITOSAN/SALICYLIC AXIT ĐỐI VỚI BỆNH ĐÓM NÂU THANH LONG (*Neoscytalidium dimidiatum*) TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI 248
Lê NghiêM Anh Tuấn, Bùi Duy Du, Phạm Trần Yến Nhi, Phạm Thanh Vũ, Chu Văn Khương, Chu Trung Kiên
31. NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN TỔ HỢP GHÉP HỒ TIÊU CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *Phytophthora capsici* GÂY BỆNH CHẾT NHANH 259
Dương Thị Oanh, Trần Thị Diệu Hiền, Nguyễn Quang Ngọc, Phạm Thị Hoài, Nguyễn Bá Huy
32. HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ BỆNH THỐI GÓC CHẢY NHỰA DO NẤM *Phytophthora* spp. GÂY HẠI CÂY CAM SÀNH (*Citrus nobilis* Lauriro) CỦA MỘT SỐ LOẠI THUỐC TRỪ BỆNH 264
Trần Thị Thường, Phan Lý Thùy Mai, Nguyễn Xuân Hoà, Mai Thị Hạnh, Nguyễn Thị Minh Nguyệt

HỘI THẢO QUỐC GIA BỆNH HẠI THỰC VẬT VIỆT NAM

Chịu trách nhiệm xuất bản
Giám đốc - Tổng biên tập
TS. LÊ LÂN

Biên tập và sửa bản in
ĐINH VĂN THÀNH - PHẠM THANH THUY
Trình bày, bìa
VŨ HẢI YẾN

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
167/6 Phương Mai - Đống Đa - Hà Nội
ĐT: (024) 38523887, (024) 38521940 - Fax: 024.35760748
Website: <http://www.nxbnongnghiep.com.vn>
E - mail: nxbnn1@gmail.com
CHI NHÁNH NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
58 Nguyễn Bình Khiêm - Q.I - Tp. Hồ Chí Minh
ĐT: (028) 38299521, 38297157 - Fax: (028) 39101036

Đối tác liên kết: Công ty Cổ phần In Sao Việt.
Địa chỉ: Số 9/40 Ngụy Như Kon Tum, Thanh Xuân, Hà Nội

In 150 bản khổ 19 × 26,5cm tại Công ty Cổ phần In Sao Việt.
Địa chỉ: Số 9/40 Ngụy Như Kon Tum, Thanh Xuân, Hà Nội.
Đăng ký KHXB số: 2323-2023/CXBIPH/1-132/NN ngày 13/7/2023.
Quyết định xuất bản số: 38/QĐ-NXBNN ngày 21/11/2023.
ISBN: 978-604-60-3804-7
In xong và nộp lưu chiểu quý IV/2023.